

# **Struktur und Halophilie eines archaealen Ferredoxins**

von

Bianca-Lucia Marg





Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades  
der Fakultät für Chemie und Pharmazie  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

## **Struktur und Halophilie eines archaealen Ferredoxins**

von

Bianca-Lucia Marg

aus

Bielefeld

München 2002



## **Erklärung**

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 13 (3) der Promotionsordnung vom 29. Januar 1998 von Prof. Dr. D. Oesterhelt betreut.

## **Ehrenwörtliche Versicherung**

Diese Dissertation wurde selbständig, ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München,

.....

Dissertation eingereicht am 4. Januar 2002

1. Berichterstatter:	Prof. Dr. D. Oesterhelt
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. W. Gärtner

Tag der mündlichen Prüfung: 22. März 2002



<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>5</b>
1.1	Extremophile Organismen	5
1.2	Faltung von Proteinen: Stabilität und Löslichkeit	6
1.3	Halophilie	9
1.4	Ferredoxin	13
1.5	Zielsetzung	18
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>20</b>
2.1	Material	20
2.1.1	Bakterienstämme	20
2.1.2	Vektoren	20
2.1.3	Oligonukleotide	21
2.1.4	Herstellerfirmen der verwendeten Geräte und Chemikalien	23
2.1.5	Geräte	24
2.1.6	Stammlösungen, Medien und Puffer	25
2.2	Mikrobiologische und Molekularbiologische Methoden	25
2.2.1	Propagierung und Aufbewahrung von <i>E. coli</i>	25
2.2.2	Propagierung und Aufbewahrung von Halobakterien	26
2.2.3	Präparation elektrokompetenter <i>E. coli</i> Zellen	27
2.2.4	Transformation elektrokompetenter <i>E. coli</i> Zellen	27
2.2.5	Präparation kompetenter <i>H. salinarum</i> Zellen und Transformation	28
2.2.6	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	29
2.2.7	Bestimmung der DNA-Konzentration	29
2.2.8	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	29
2.2.9	Gelelektrophorese von DNA	30
2.2.10	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	31
2.2.11	Isolierung von genomischer DNA aus <i>H. salinarum</i> und <i>H. volcanii</i>	31
2.2.12	Restriktionsverdau von DNA	31
2.2.13	Ligation von DNA-Fragmenten	32
2.2.14	DNA-Sequenzierung	32
2.2.15	Ortsspezifische Mutagenese nach der Zwei-Schritt-PCR-Methode	33
2.2.16	Herstellung der Genfragmente für die Mutanten Fdxana und Fdxequi	34
2.3	Proteinchemische Methoden	34
2.3.1	SDS-Gelelektrophorese	34
2.3.2	Färben von SDS-Gelen	36
2.3.3	Western Blot	37

2.3.4	Proteinbestimmung nach Bradford und BCA-Methode	38
2.3.5	Aufkonzentrieren von Proteinen	39
2.3.6	Proteinsequenzanalysen	39
2.3.7	Massenspektrometrische Untersuchung von Proteinen	40
<b>2.4</b>	<b>Markierung von Proteinen in <i>H. salinarum</i></b>	<b>40</b>
2.4.1	Herstellung von $^{15}\text{N}$ und $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ -markiertem Algenpepton	40
2.4.2	Kultivierung markierter <i>H. salinarum</i> Zellen	42
<b>2.5</b>	<b>Proteinexpression und Proteinaufreinigung</b>	<b>44</b>
2.5.1	Prinzipien der verschiedenen Säulenchromatographien	44
2.5.2	Überexpression von Fdxana	44
2.5.3	Überexpression der GST-Fusionsproteine	45
2.5.4	Aufreinigung des Fdxana	45
2.5.5	Aufreinigung der GST-Fusionsproteine	46
2.5.6	Aufreinigung von Ferredoxin aus Halobakterien	46
2.5.7	Aufreinigung des Ferredoxins aus <i>H. volcanii</i>	48
2.5.8	Reinigung von His-Tag Ferredoxin mit Hilfe einer Ni-NTA-Säule	48
2.5.9	Rekonstitution des HsFdx	49
2.5.10	Aufnahme von UV/VIS Spektren	50
2.5.11	Circulardichroismus (CD)-Spektroskopie	51
2.5.12	Differential Scanning Calorimetry (DSC)	51
<b>2.6</b>	<b>Strukturbestimmung anhand der NMR Daten</b>	<b>52</b>
2.6.1	Theoretische Grundlagen	52
2.6.2	Vektormodell	54
2.6.3	Aufnahme von NMR-Spektren: 1D-NMR-Experiment	55
2.6.4	Zwei- und mehrdimensionale NMR Spektroskopie	57
2.6.5	Signalzuordnung	60
2.6.6	Berechnung der Proteinstruktur	61
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>63</b>
<b>3.1</b>	<b>Teil A: Stabilitäts- und NMR-Messungen am HsFdx</b>	<b>63</b>
3.1.1	Isolierung und Aufreinigung des Ferredoxins aus <i>H. salinarum</i> , HsFdx	63
3.1.2	Stabilitätsmessungen am HsFdx in Abhängigkeit von der Salzkonzentration	67
3.1.3	UV-VIS spektroskopische Untersuchungen von HsFdx	68
3.1.4	DSC und CD Messungen: Übergangstemperaturen der Entfaltung des HsFdx in Abhängigkeit von der Salzkonzentration	72
3.1.5	Rekonstitution des Apo-HsFdx mit dem Eisen-Schwefel-Clusters	74
<b>3.2</b>	<b>NMR-Struktur des HsFdx</b>	<b>75</b>
3.2.1	Isotopenmarkierung von HsFdx	76

3.2.2	NMR-Daten für HsFdx	78
3.2.3	Struktur des HsFdx	85
3.2.4	Flexibilität der Aminosäurereste des HsFdx	87
3.2.5	Temperaturabhängige Entfaltung des HsFdx	88
<b>3.3</b>	<b>Teil B: Herstellung von Mutanten des HsFdx und ihre Charakterisierung im Vergleich zu HsFdx</b>	<b>92</b>
3.3.1	Klonierung der Mutanten	94
3.3.2	Expression von rekombinant erzeugtem HsFdx und den Mutanten Fdxana und Fdxequi	96
3.3.3	Rekonstitution und Aufreinigung der rekombinant erzeugten Proteine	99
3.3.4	Stabilität von Fdxana in Abhängigkeit von der Salzkonzentration	105
<b>3.4</b>	<b>DNA- und Aminosäuresequenz des Ferredoxins aus <i>H. volcanii</i></b>	<b>106</b>
<b>3.5</b>	<b>Übersicht der Ergebnisse</b>	<b>108</b>
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>110</b>
<b>4.1</b>	<b>NMR-spektroskopische Untersuchungen des HsFdx</b>	<b>110</b>
4.1.1	Voraussetzung der Probenbeschaffenheit für die Aufnahme der NMR-Spektren vom HsFdx	111
4.1.2	Strukturanalyse des HsFdx	112
<b>4.2</b>	<b>Das 2Fe-2S Ferredoxin aus dem moderat halophilen Organismus <i>H. volcanii</i></b>	<b>115</b>
<b>4.3</b>	<b>Ist HsFdx als Modellsystem für halophile Proteine geeignet?</b>	<b>116</b>
4.3.1	Die Stabilität des HsFdx in Abhängigkeit von der Salzkonzentration im Vergleich zu anderen halophilen Proteinen	117
4.3.2	Faltung und Rekonstitution des HsFdx sind abhängig von der NaCl-Konzentration	120
4.3.3	Homogene Flexibilität der Aminosäurereste und gleichzeitige Entfaltung der verschiedenen Strukturelemente des HsFdx	120
<b>4.4</b>	<b>Funktion der Extradomäne</b>	<b>122</b>
4.4.1	Natur der Extra-Domäne	123
4.4.2	Übersicht über bisher bekannte Strukturmerkmale halophiler Proteine	124
4.4.3	Deletion der aciden Extradomäne des HsFdx	127
<b>4.5</b>	<b>Clustereinbau, Faltung und Stabilität von Fdxana</b>	<b>129</b>
4.5.1	Überblick über Faltung und Rekonstitution von Ferredoxinen	130
4.5.2	UV-VIS spektroskopische Untersuchungen zur Stabilität und Faltung von Fdxana im Vergleich zu Pflanzentypferredoxinen und HsFdx	132
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>134</b>
<b>6</b>	<b>Anhang</b>	<b>136</b>
<b>6.1</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>136</b>

<b>6.2</b>	<b>Abkürzungen der Aminosäuren/ Einbuchstabencode</b>	<b>138</b>
<b>6.3</b>	<b>Tabellarische Übersicht: HsFdx und Fdxana im Vergleich</b>	<b>139</b>
6.3.1	Rekonstitution von HsFdx und Fdxana	139
6.3.2	Löslichkeit und Stabilität von HsFdx und Fdxana	139
<b>7</b>	<b><i>Literatur</i></b>	<b>140</b>



# 1 Einleitung

## 1.1 Extremophile Organismen

Als sich das Leben auf der Erde entwickelte, geschah dies unter anderen physikochemischen Gegebenheiten als denen, die heute als „physiologisch“ bezeichnet werden. Zu den physikalischen Parametern zählten Temperatur und Druck, die chemischen Variablen waren pH-Wert, Redoxpotenzial und Salzkonzentration eines Milieus. Menschliches Leben ist nur möglich, wenn diese Parameter in einem begrenzten Bereich variieren. Menschen gehören zu den „Mesophilen“, das „Gleichmaß liebende“ Organismen, deren Wachstumsoptimum bei neutralem pH-Wert, in einem Temperaturbereich von 20-45 °C und Salzkonzentrationen von 150 mM liegt.

Trotzdem sind Organismen bekannt, die in ökologischen Nischen unter extremen Bedingungen gedeihen. Die Geysire im Yellowstone National Park (USA) sind eine Fundgrube für Extremophile, das „Außergewöhnliche liebende“ Organismen (Madigan & Marrs, 1997), (Rothschild & Mancinelli, 2001). In diesen heißen Quellen wachsen Thermophile und Hyperthermophile, deren Wachstumsoptimum bei Temperaturen größer 45 °C und 80 °C respektive liegt. Psychrophile (Kälte liebende) hingegen sind bis zu Temperaturen von -19 °C aktiv, solche Organismen leben z.B. im Himalaja oder in der Antarktis. Weiterhin findet man Extremophile in nahezu gesättigten Salzlösungen wie dem Toten Meer, dem Great Salt Lake in Utah oder trockengelegten Meerwasserbassins. Dort wachsen Halophile (Salz liebende), welche anhand ihrer rötlichen Farbe (die von Bakterioruberinen verursacht wird) gut zu erkennen sind.

Nach der Entdeckung der ersten Extremophilen kam die Frage auf, ob diese Organismen die ungewöhnlichen Bedingungen nur tolerieren oder sogar darauf angewiesen sind. Thermophile und Psychrophile zeigen geringere Wachstumsraten bei Temperaturen um 20 °C, und Halophile lysieren, wenn sie mit Lösungen geringer Salzkonzentration in Kontakt kommen. Sie können also nur unter Bedingungen existieren, die für mesophile Organismen letal sind.

Der größte Teil der exotischen Mikroorganismen gehört zu den Archaea. Sie wurden zuerst zu den Bakterien gezählt, bis Carl Woese unter anderem anhand des Vergleichs der 16S Untereinheiten der ribosomalen RNA feststellte, dass diese Mikroorganismen eine eigene

Klasse neben Bakterien und Eukaryonten darstellen. Die Archaea divergierten sehr früh nach der Entstehung des Lebens auf der Erde von einem gemeinsamen Vorfahren (Wheelis et al., 1992), (Woese et al., 1990). Anfangs wurden sie vor allem in ungewöhnlichen Lebensräumen gesucht, da man davon ausging, dass sie in Nischen überlebt haben, deren Gegebenheiten denen auf der Urerde ähneln. Heutzutage ist bekannt, dass Archaea überall zu finden sind (Olsen, 1994).

Seit einigen Jahren versuchen Forscher, die Anpassung der Extremophilen an ihre Umwelt zu erklären. Temperatur, Druck, pH-Wert und Salzkonzentration haben Einfluß auf die Struktur der Proteine, der DNA und auch der Membran, und somit auf deren Funktionsfähigkeit.

Thermophile Organismen wurden bisher am umfangreichsten untersucht. Die Suche nach besonderen Strukturen oder Mechanismen, die eine Anpassung an die extremen äußeren Bedingungen gewährleisten, war nicht erfolgreich. Statt dessen wurde festgestellt, daß die Adaptierung mit Hilfe derselben schwachen elektrostatischen Wechselwirkungen und hydrophoben Interaktionen erreicht wird, welche für die Balance zwischen Stabilität und Flexibilität von mesophilen Proteinen sorgen (Jaenicke, 1991), (Jaenicke & Böhm, 1998).

## 1.2 Faltung von Proteinen: Stabilität und Löslichkeit

Die native Konformation eines Proteins ist unter physiologischen Bedingungen nur geringfügig stabiler als die entfaltete, inaktive Konformation (etwa 40 kJ/mol)(Voet et al., 1999). Ein Maß für die Stabilität der gefalteten Konformation ist die Änderung der freien Energie  $\Delta G_{U \leftrightarrow N}$  (U: *unfolded*, N: *native*) der Reaktion:

Entfaltete/denaturierte Konformation (U)  $\leftrightarrow$  gefaltete/native Konformation (N)

$$\Delta G_{U \leftrightarrow N} = \Delta H_{U \leftrightarrow N} - T \Delta S_{U \leftrightarrow N} \quad (\Delta H: \text{Änderung der Enthalpie; } \Delta S: \text{Änderung der Entropie})$$

Damit sich ein Protein spontan faltet, muß  $\Delta G_{U \leftrightarrow N}$  negativ sein. Den größten Anteil an den destabilisierenden Kräften der Entropie  $S_N$  im nativen Zustand liefert die konformationelle Entropie, da das Protein nur eine von etwa  $10^n$  (n: Anzahl der Aminosäuren) möglichen Faltungen einnimmt. Die  $10^n$  Faltungsmöglichkeiten sind eine grobe Abschätzung, welche von Levinthal gemacht wurde (Levinthal, 1969). Ein Protein mit n Aminosäuren hat  $2^n$  Torsionswinkel,  $\phi$  und  $\psi$ , von denen jeder drei stabile Werte einnehmen kann, daraus folgt

$3^{2n} \approx 10^n$ . Diese Berechnung bezieht nur die verschiedenen Konformationen des Proteinrückgrates mit ein, die möglichen Stellungsisomere der Seitenketten werden nicht berücksichtigt. Der negative Beitrag der konformationellen Entropie beträgt etwa 7 kJ/mol pro Aminosäurerest, also 700 kJ für ein Protein mit 100 Aminosäuren (Pace, 1995).

Die stabilisierenden Kräfte resultieren aus Wasserstoffbrückenbindungen und vor allem aus hydrophoben Wechselwirkungen. Proteine enthalten viele Aminosäuren mit hydrophoben Seitenketten. In der nativen Konformation befindet sich der Großteil der hydrophoben Aminosäuren im Inneren des Proteins - abgeschirmt von der wässrigen Umgebung. Im ungefalteten Zustand hingegen sind sie in Kontakt mit polaren Wassermolekülen, die sich um die hydrophobe Gruppe räumlich fest anordnen. Damit wird die Beweglichkeit dieser Wassermoleküle eingeschränkt, ihre Freisetzung bei der Faltung des Proteins liefert einen positiven Anteil zur Entropie  $S_N$  des gefalteten Systems. Dieser hydrophobe Effekt wiegt den negativen Beitrag der konformationellen Entropie auf und trägt zu einem erheblichen Teil zur Faltung des Proteins bei.

Wasserstoffbrückenbindungen haben mit insgesamt etwa 20 kJ/mol einen deutlich geringeren Anteil an der Proteinstabilität, da im entfalteten Zustand ebenfalls Wasserstoffbrückenbindungen zu Wassermolekülen ausgebildet werden. Allerdings sind sie ausschlaggebend dafür, welche der möglichen Konformationen eines Proteins die native Faltung darstellt.

Die elektrostatischen Wechselwirkungen eines Ionenpaares (einer Salzbrücke) zwischen entgegengesetzt geladenen Seitenketten eines Proteins (wie zum Beispiel Glutamat und Arginin) steuern nur einen kleinen Energieterm zur Stabilisierung der nativen Konformation bei (etwa 0-4 kJ/mol), wenn sich das Ionenpaar an der Oberfläche des Moleküls befindet. Durch die elektrostatische Wechselwirkung wird die Flexibilität der Seitenketten an der Oberfläche des Proteins stark eingeengt und liefert dadurch einen negativen Entropiebeitrag. Bei Salzbrücken innerhalb des Proteins entfällt dieser destabilisierende Anteil, und deshalb tragen Salzbrücken im Innern des Proteins etwa 10-20 kJ/mol zur Stabilisierung bei.

Die negativen Entropieeffekte und die positiven Beiträge der hydrophoben Wechselwirkungen im Zusammenspiel mit den Wasserstoffbrückenbindungen und den Ionenpaaren ergeben für die Änderung der freien Energie eines Proteins bei der Faltung einen Betrag von etwa 40 kJ/mol unter physiologischen Bedingungen. Dies entspricht der Energie von nur einigen wenigen Wasserstoffbrückenbindungen oder Ionenpaaren. Je stärker die stabilisierenden Kräfte im nativen Zustand sind, desto starrer ist ein Protein. Da aber viele Enzyme ihre Funktion erst durch Konformationsänderungen ausüben können, ist eine gewisse

Flexibilität der Reste und des Aminosäurerückgrates erforderlich. Der geringe Wert für  $\Delta G_{U \leftrightarrow N}$  läßt sich also dadurch erklären, dass eine Balance zwischen der Stabilität des Proteins und seiner Flexibilität geschaffen werden muß.

Temperatur, Druck, pH-Wert und Ionenstärke der Lösung nehmen Einfluß auf die oben beschriebenen Kräfte und Energien. Eine Änderung dieser Parameter kann bewirken, dass die native Konformation eines Proteins destabilisiert wird, und eine Entfaltung des Proteins erfolgt. Somit liegen Proteine immer nur in einem engen Parameterbereich korrekt gefaltet vor.

Viele denaturierte Proteine falten sich unter physiologischen Bedingungen „*in vitro*“ spontan in ihre native Konformation zurück. Berechnungen, die auf Cyrus Levinthal zurückgehen, haben ergeben, dass die Faltung nicht zufällig passieren kann, indem ein Protein wahllos verschiedene Konformationen einnimmt: Ein Protein mit  $n$  Aminosäuren hat ca.  $10^n$  Faltungsmöglichkeiten, eine Umorientierung würde mindestens  $10^{-13}$  Sekunden in Anspruch nehmen (Levinthal, 1969). Daraus folgt, dass es  $t = 10^n / 10^{-13}$  Sekunden dauern würde, alle Konformationen zu durchlaufen. Bei einem kleinen Protein mit 100 Aminosäuren entspricht dies einer Zeit von  $10^{87}$  Sekunden. Diese Zeitspanne überschreitet bei weitem das derzeitige Alter des Universums ( $6 \times 10^{17}$  Sekunden  $\cong$  20 Milliarden Jahre). Diese Berechnung ist als „Levinthal Paradoxon“ bekannt.

Bisherige Untersuchungen haben gezeigt, dass bestimmte hydrophobe Bereiche eines Proteins innerhalb von wenigen Millisekunden eine definierte Sekundärstruktur einnehmen (*molten globule state*), bevor sich die Tertiärstruktur eines Proteins dann im Laufe von Millisekunden bis hin zu einigen Minuten ausbildet (Frydman et al., 1999).

„*In vivo*“ falten sich 70% der Proteine spontan. Es gibt aber zusätzlich Proteine, denen die Aufgabe von Faltungshelfern zugeschrieben wird, die Chaperone. Ungefaltete Proteine im Cytosol werden von ihnen erkannt, gebunden und bei der Faltung unterstützt. Chaperone sind auf der einen Seite vor allem an der Faltung großer Proteine beteiligt. Auf der anderen Seite sind sie insbesondere dann notwendig, wenn im Cytosol eine Ansammlung denaturierter Moleküle auftritt. Dies ist zum Beispiel nach einem Hitzeschock der Fall. Da Chaperone unter diesen Bedingungen verstärkt exprimiert werden, wurden sie bei ihrer Entdeckung als Hitzeschockproteine bezeichnet (Heat Shock Protein – Hsp). Die Chaperone werden in zwei Klassen unterteilt: Bei den Hsp70s handelt es sich um 70 kDa schwere Proteine, die sich unter ATP Hydrolyse an hydrophobe Peptidsegmente eines Proteins anlagern (Netzer & Hartl, 1998), (Frydman & Hartl, 1996). Dadurch wird eine nicht-native Faltung vermieden, die zur

Aggregation führen würde. Neben den Hsp's sind die Chaperonine bekannt, bei denen es sich um große zylindrische Komplexe handelt. Das Chaperonin GroEL aus *E. coli* z.B. setzt sich aus zwei übereinander liegenden Ringen zusammen, die jeweils aus neun, 60 kDa schweren Monomeren gebildet werden. Im Inneren des „Donught“ ähnlichen Gebildes kann die Faltung größerer Proteine abgeschirmt von Wechselwirkung mit anderen cytosolischen Proteinen stattfinden.

Damit ein lösliches Protein seine Funktion erfüllen kann, muß es nicht nur die korrekte dreidimensionale Struktur ausbilden, sondern auch löslich sein. Wenn die Ionenstärke der Lösung zunimmt, konkurrieren die hydrophoben Seitenketten des Proteins mit den Ionen um die Wassermoleküle, die hydrophoben Kräfte werden größer. Dies kann zur Bildung unlöslicher Aggregate führen, die eine Funktion des Proteins verhindern.

### 1.3 Halophilie

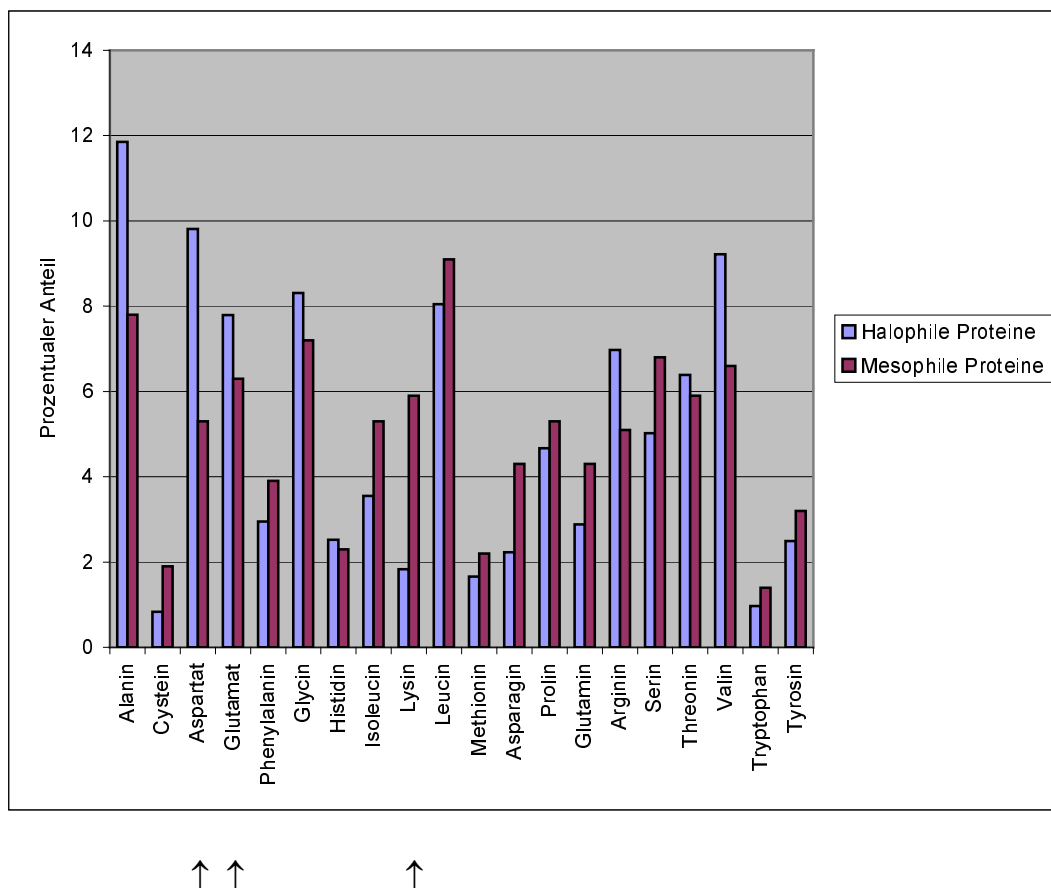
Die meisten Organismen sind in Lösungen hoher Salzkonzentration nicht lebensfähig, da ihr Cytosol eine geringere Ionenstärke besitzt, und durch den osmotischen Druck die Zellen entwässert werden.

Um das Jahr 1900 wurde festgestellt, dass die rötliche Färbung von in Salz eingelegten Fischen, Leder und Eingeweiden, von Bakterien stammt (Larsen, 1967). Bisher war nicht für möglich gehalten worden, dass unter solchen Bedingungen Organismen wachsen können. Seitdem wurde aber eine Vielzahl dieser außergewöhnlichen Mikroorganismen im Toten Meer, dem Great Salt Lake und überall dort, wo sich Salzablagerungen befinden, identifiziert. Halophile Organismen können nur in gesättigten Salzlösungen leben. Als „halotolerant“ hingegen werden Organismen bezeichnet, die unter Niedrigsalzbedingungen wachsen, aber auch in Gegenwart hoher Salzkonzentrationen lebensfähig sind. Das halophile Archaeobakterium *Halobacterium salinarum* (*H. salinarum*) z. B. wächst optimal bei 4.3 M NaCl (entspricht 250 g/l), während bei Salzkonzentrationen kleiner 2.0 M NaCl kein Wachstum der Zellen festgestellt werden konnte (Ginzburg et al., 1970). Das Cytosol von *H. salinarum* weist hohe Konzentrationen an KCl (etwa 4 M) und auch NaCl (etwa 1 M) auf, was bedeutet, dass sämtliche Zellbestandteile in Hochsalzlösung aktiv sein müssen (Christian & Waltho, 1962). Proteine mesophiler Organismen sind unter derartigen Bedingungen nicht funktionsfähig, da sie aggregieren und aus der Lösung ausfallen. Halotolerante Proteine liegen sowohl unter

Hochsalz- als auch unter Niedrigsalzbedingungen in ihrer nativen Konformation vor. Ihre Stabilität nimmt aber nicht mit steigender Salzkonzentration zu.

Dagegen entfalten viele halophile Proteine bei niedrigen Salzkonzentrationen. Erste Hinweise, worauf die Anpassung an die hohen Salzkonzentrationen zurückzuführen ist, gibt die Aminosäurezusammensetzung halophiler Proteine im Vergleich zu mesophilen Proteinen (s. Abbildung 1).

**Abbildung 1:** Die Angaben zu der Aminosäureverteilung von mesophilen Proteinen stammen aus dem Voet, Voet, Pratt „Fundamentals of Biochemistry“. Der Anteil der verschiedenen Aminosäuren an halophilen Proteinen wurde von F. Pfeiffer und J. Wolfertz im Zusammenhang mit dem Genomprojekt von D. Oesterhelt zur Entschlüsselung des Genoms von *H. salinarum* berechnet. Zu diesem Zweck wurde über einen Datensatz von etwa 1500 der wahrscheinlichsten Proteine von *H. salinarum* gemittelt.



Auffällig ist der deutlich höhere Anteil an Aminosäuren mit negativ geladenen Seitenketten, Glutamat und Aspartat, in halophilen Proteinen im Vergleich zu ihrem Vorkommen in mesophilen Proteinen. Dabei ist anzumerken, dass bevorzugt Aspartat und nicht Glutamat eingebaut wird. Halophile Proteine enthalten weniger positiv geladene Aminosäuren. Das ist vor allem auf den geringen Anteil an Lysinresten zurückzuführen. Argininreste sind hingegen

in halophilen Proteinen häufiger vertreten als in den entsprechenden mesophilen [siehe auch (Madern et al., 1995), (Britton et al., 1998)]. Die Argininseitenkette ist häufig an der Ausbildung von Salzbrücken im Inneren eines Proteins beteiligt und trägt somit zu seiner Stabilisierung bei. Anstelle sterisch anspruchsvoller hydrophober Aminosäuren wie Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin werden in halophilen Proteinen im Vergleich zu mesophilen verstärkt Aminosäuren mit kleinen hydrophoben Resten wie Valin und Alanin gefunden.

Die Berechnung der Oberflächenladung halophiler Proteine, deren Strukturen aufgrund von Homologiebetrachtungen von Essen (unveröffentlicht) modelliert wurden, ergab, dass die negative Oberflächenladung dieser Proteine deutlich größer ist als bei den mesophilen Analoga. Carboxylgruppen zeigen mit bis zu sechs Wassermolekülen eine stärkere Hydratisierung als die Aminofunktion der Lysinreste, die nur zwei Wassermoleküle bindet (Kuntz, 1971). Dies könnte eine bessere Löslichkeit in Hochsalz zur Folge haben, wenn das Protein mit den Ionen in der Lösung um die vorhandenen Wassermoleküle konkurrieren muß. Halophile Proteine weisen eine größere Hydrathülle auf als ihre mesophilen Analoga (Ebel, Faou et al., 1999), (Eisenberg et al., 1992).

Weiterhin wurde bei den bisher bekannten Kristallstrukturen und Modellen halophiler Proteine festgestellt, dass sich die negativ geladenen Seitenketten fast ausschließlich auf der Oberfläche des Moleküls befinden und in Clustern angeordnet sind, die teilweise hydratisierte Kaliumionen binden (Richard et al., 2000) (Britton et al., 1998) (Jolley et al., 1997) (Frolova et al., 1996), (Pieper et al., 1998). In mesophilen Proteinen wurde bisher nicht beobachtet, dass Kationen aus der Lösung in die Kristallhydrathülle eingebaut werden. Eine Salzbindung findet nur im denaturierten Zustand mit besonderen Salzen wie z.B. Guanidiniumhydrochlorid statt (Eisenberg et al., 1992).

Erste Rechnungen geben Hinweise darauf, dass die elektrostatische Abstoßung der negativ geladenen Seitenketten der Hauptgrund für die Entfaltung der halophilen Proteine bei geringeren Salzkonzentrationen ist (Elcock & McCammon, 1998), (Rao & Argos, 1981). Die Abstoßung der Glutamat- und Aspartatreste wirkt bei hohen Ionenstärken einer Agglomeration der Proteine aufgrund der steigenden hydrophoben Wechselwirkungen entgegen. Weiterhin wird angenommen, dass die Wechselwirkung mit den hydratisierten Kationen ebenfalls zur Stabilisierung des nativen Zustandes beiträgt (Eisenberg, 1995), (Madern et al., 2000), (Madigan & Oren, 1999).

Einige halophile Proteine weisen neben der Anhäufung negativer Reste an der Oberfläche noch eine weitere Besonderheit auf, wenn man sie mit ihren Pendants aus mesophilen Organismen vergleicht. Die Aminosäuren in der Umgebung des aktiven Zentrums sind stark konserviert (Sticht & Rösch, 1998). Der Vergleich der Primärsequenzen ergibt jedoch, dass halophile Proteine zusätzliche Aminosäuren enthalten, die für sich eine kleine Strukturdomäne ausbilden, bei denen der Anteil an Aspartat und Glutamat größer 40% ist (Hickmann & Oesterhelt, unveröffentlicht). Dies läßt die gedankliche Aufteilung dieser halophilen Proteine in zwei Teile zu: ein konserviertes aktives Zentrum und eine Domäne, die für die Anpassung an die äußeren Bedingungen und somit für die Stabilisierung des Proteins verantwortlich ist.

Zu den bisher am besten untersuchten halophilen Proteinen gehören die Malat-Dehydrogenase aus *H. marismortui* (HmMDH) sowie der Elongationsfaktor EF-Tu (HmEF-Tu) aus demselben Organismus (Bonnete et al., 1993) (Bonnete et al., 1994), (Dym et al., 1995), (Madern et al., 1995), (Madern & Zaccai, 1997). Die Stabilität der HmMDH wurde in Abhängigkeit von verschiedenen Ionen mit Hilfe unterschiedlicher Techniken bestimmt (Ebel et al., 1999a). Dabei wurde festgestellt, dass das Verhalten halophiler Proteine nicht nur von der allgemeinen Salzkonzentration, sondern auch von der Art der Ionen in der Lösung abhängt. Wachsende Konzentrationen der für Halobakterien physiologischen Salze Natrium- und Kaliumchlorid führen zu einer zunehmenden Stabilisierung der HmMDH. In Magnesiumchloridlösung hingegen ist die Stabilität der HmMDH schon bei 0.8 M maximal, oberhalb von 1.5 M  $MgCl_2$  denaturiert das Enzym.

Es wurde ebenfalls gezeigt, dass nicht nur der Anteil der negativen Reste eine Rolle spielt, sondern auch deren räumliche Anordnung auf der Oberfläche des Proteins entscheidend ist. Die Punktmutation E243R bei der HmMDH bewirkte entgegen der Erwartung eine Verstärkung des halophilen Verhaltens, das heißt, dass diese Mutante höhere Salzkonzentrationen benötigte, um aktiv zu sein.

Mit den Untersuchungen der Stabilität von HmEF-Tu in Lösungen verschiedener Ionenarten und -konzentrationen konnten die Ergebnisse für HmMDH bestätigt und auf die Tertiärstruktur des Proteins zurückgeführt werden. Die HmMDH liegt in ihrer aktiven Form als Tetramer vor, während HmEF-Tu als Monomer in Lösung existiert (Ebel et al., 1992).

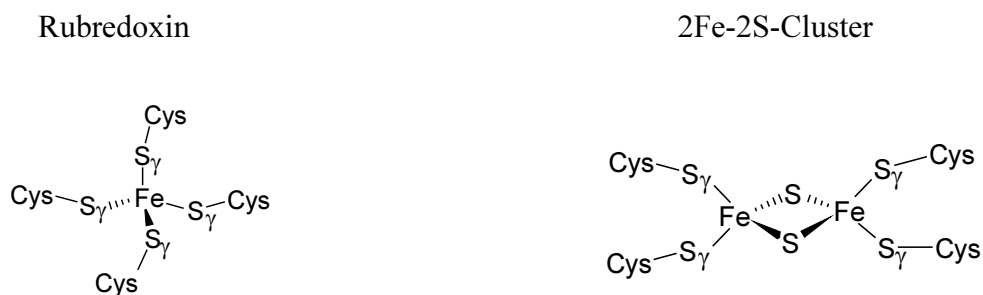


## 1.4 Ferredoxin

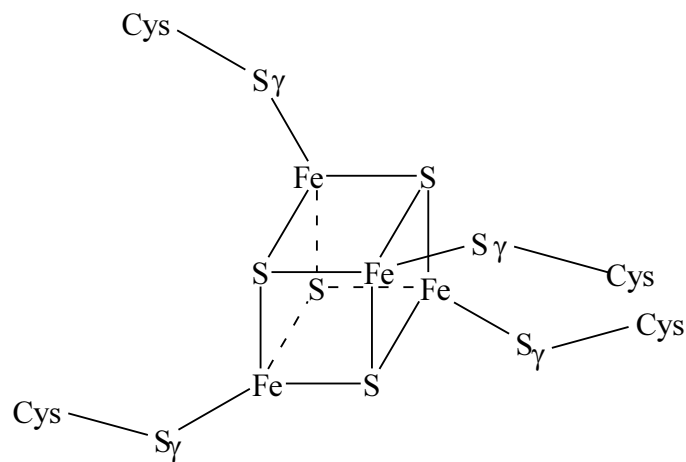
Ferredoxine sind Proteine, die in ihrem aktiven Zentrum ein oder mehrere nicht-Häm Eisenatome besitzen (Sticht & Rösch, 1998). In jedem bisher untersuchten Organismus, von den Archaea über Bakterien und Pflanzen bis hin zu Vertebraten, wurden Ferredoxine identifiziert. Deshalb geht man davon aus, dass diese Proteine sehr früh in der Evolution auftraten.

Man unterscheidet Rubredoxine, die nur ein Eisenatom über vier Cysteinreste gebunden haben, von Ferredoxinen, deren aktives Zentrum aus einem Eisen-Schwefel-Cluster besteht. 2Fe-2S und 4Fe-4S Cluster treten am häufigsten auf, aber es gibt auch 3Fe-4S Cluster und solche mit einer größeren Anzahl an Eisenatomen und anorganischem Schwefel. Dabei werden die Eisen-Schwefel-Cluster über koordinierende Cysteingruppen in das Protein eingebaut (s. Abbildung 2). Findet eine Entfaltung des Proteins statt, ist eine Koordination des Clusters nicht mehr möglich und der Eisen-Schwefel-Cluster zerfällt in seine Bestandteile.

**Abbildung 2: Eisen-Schwefel-Cluster unterschiedlicher Zusammensetzung.**



4Fe-4S-Cluster



Ferredoxine dienen bei der Katalyse unterschiedlichster Redoxreaktionen in anaeroben und aeroben Organismen als Elektronentransportproteine. Sie sind beteiligt an der Stickstofffixierung, der oxidativen Phosphorylierung, dem  $H_2$ -Metabolismus, der Dehydratisierung, der mitochondrialen Hydroxylierung und vielen anderen Redoxreaktionen.

Beim Rubredoxin ändert sich der Redoxzustand des Proteins durch die Reduktion des  $Fe^{3+}$  zu  $Fe^{2+}$ . Ferredoxin mit einem 2Fe-2S Cluster enthält im oxidierten Zustand zwei antiferromagnetisch gekoppelte high-spin  $Fe^{3+}$ , während in der reduzierten Form ein  $Fe^{3+}$  und ein  $Fe^{2+}$  vorliegen. Somit sind diese Proteine in der Lage,  $1-e^-$  Elektronenübertragungen zu katalysieren.

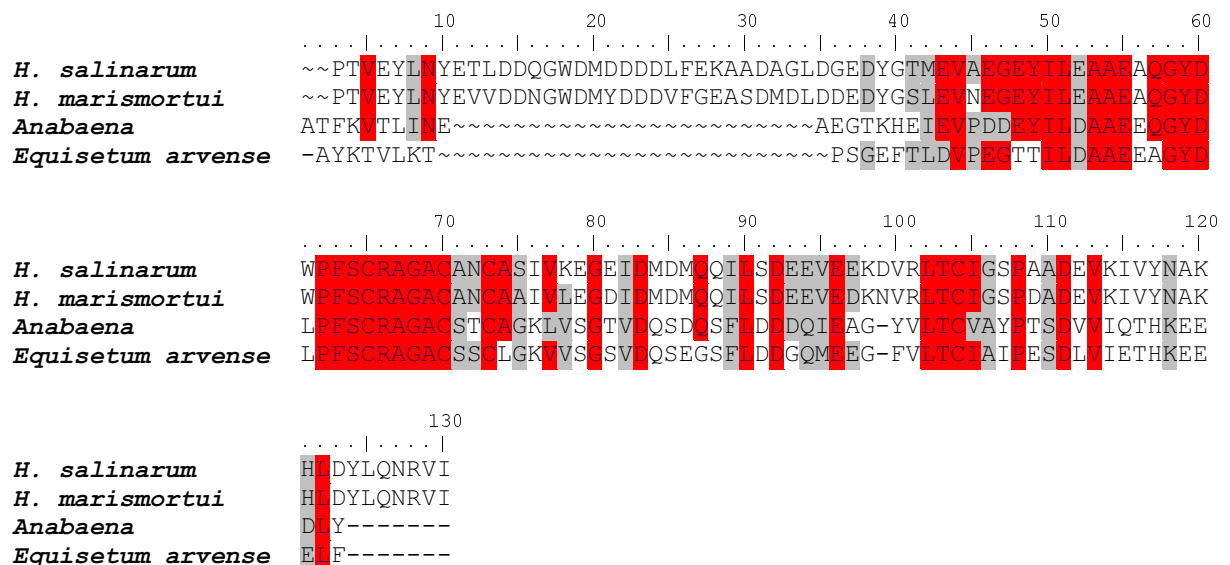
Sogenannte Pflanzentypferredoxine mit einem 2Fe-2S Cluster dienen in grünen Pflanzen, Algen und Cyanobakterien als Elektronenakzeptor des Photosystems I in der oxygenen Photosynthese. Das reduzierte Ferredoxin überträgt anschließend ein Elektron auf den FAD-Cofaktor der Fdx- $NADP^+$ -Reduktase (FNR), die  $NADP^+$  zu NADPH reduziert. Das Redoxpotenzial von Pflanzentypferredoxinen beträgt etwa -400 mV.

Aus den Halobakterien *H. salinarum* und *H. marismortui* wurden Ferredoxine isoliert, die den Pflanzentypferredoxinen in ihren strukturellen und spektroskopischen Eigenschaften sehr ähnlich sind, aber keine Rolle bei der Photosynthese spielen. Zu den Vertebraten-Ferredoxinen besitzen sie hingegen keine signifikanten Homologien. Das führte zu der Vermutung, dass die Ähnlichkeit von halophilen 2Fe-2S Ferredoxinen und Pflanzentypferredoxinen auf einen lateralen Gentransfer zurückzuführen ist (Pfeifer et al., 1993).

Kerscher und Oesterheldt isolierten 1976 ein 2Fe-2S Ferredoxin aus *H. salinarum* (HsFdx) (Hase et al., 1977), (Kerscher et al., 1976). Dieses Protein mit einem Molekulargewicht von 14.6 kDa enthält mit 128 Aminosäuren etwa 30 Aminosäuren mehr als Ferredoxine aus Blaualgen und Pflanzen, deren Ferredoxine aus 93-99 Aminosäuren bestehen. Die Absorptionsmaxima im sichtbaren Bereich bei 329 nm, 420 nm und 467 nm sind mit denen von Pflanzentypferredoxinen vergleichbar, während das Redoxpotential mit -350 mV weniger negativ ist.

Die Sequenzhomologien zwischen den verschiedenen Ferredoxinen liegen bei etwa 50-70 %, die Sequenzidentität beträgt zwischen 30-40 % (Pfeifer et al., 1993) (s. Abbildung 3). Im N-terminalen Bereich besitzt das halophile Ferredoxin eine Insertion von 30 Resten, wobei 13 dieser Aminosäuren Glutamat und Aspartat sind. Da der Überschuß an negativen Resten charakteristisch für halophile Proteine ist, liegt die Vermutung nahe, dass diese N-terminale Region die Anpassung des HsFdx an das Leben in konzentrierten Salzlösungen ermöglicht.

**Abbildung 3:** Der folgende Sequenzvergleich wurde mit dem Programm ClustalW erstellt. Die Aminosäuren, die in drei oder mehr Sequenzen identisch sind, wurden rot hinterlegt. Grau hinterlegt wurden die Aminosäuren, die in drei oder mehr Sequenzen ähnlich sind. *Equisetum arvense* gehört zu der Familie der Schachtelhalme.



1978 wurde von Werber und Mevarech ein Ferredoxin aus *H. marismortui* aufgereinigt (HmFdx) (Werber & Mevarech, 1978b). Die beiden halophilen Ferredoxine HmFdx und HsFdx besitzen eine Sequenzhomologie von über 90 %, die Absorptionsmaxima und das Redoxpotential sind ebenfalls nahezu identisch.

1996 gelang Frolow *et al.* die Aufklärung der Kristallstruktur von *H. marismortui* Ferredoxin mit einer Auflösung von 1.9 Å (Frolow et al., 1996). Der hydrophobe Kern des HmFdx wird

aus einem gemischten, viersträngigen  $\beta$ -Faltblatt gebildet, das von einer Helix flankiert wird. Die Stränge  $\beta_1$  und  $\beta_2$  verlaufen antiparallel und werden durch zwei amphipatische Helices verbunden, die eine Extra-Domäne ausbilden. In Pflanzentypferredoxinen befindet sich anstelle dieser N-terminalen Insertion ein Loop.

Eine Überlagerung der 78 entsprechenden  $C_\alpha$ -Atome des HmFdx mit dem Pflanzentypferredoxin aus *Anabaena* liefert einen *rmsd* (root mean square deviation) Wert der beiden Strukturen von 0.95 Å. Die erhöhte Wasserbindungskapazität der negativen Reste des halophilen Proteins wurde als Ursache für die Anpassung an Hochsalzbedingungen postuliert (Frolova et al., 1996). Unter denselben Kristallisationsbedingungen bindet Lysozym allerdings ebenso viele Wassermoleküle. HmFdx zeigt jedoch eine deutliche Erhöhung der Wasserstoffbrückenbindungen pro Wassermolekül (1.83 statt 1.28 Wasserstoffbrückenbindungen pro Wassermolekül). Der Eisen-Schwefel-Cluster des aktiven Zentrums befindet sich in einem langen Loop-Segment nahe der Oberfläche des Moleküls, ist aber für Wassermoleküle unzugänglich.

Dem Ferredoxin von *H. marismortui* wurde zuerst eine Funktion als Elektronenakzeptor bei der Stickstofffixierung zugeschrieben (Werber & Mevarech, 1978a). Für HsFdx hingegen wurde später nachgewiesen, dass das halophile Ferredoxin als Elektronenakzeptor an der Decarboxylierung von  $\alpha$ -Ketosäuren beteiligt ist (Kerscher & Oesterhelt, 1981). In den Mitochondrien und bei vielen Bakterien erfolgt diese oxidative Decarboxylierung von  $\alpha$ -Oxosäuren wie z.B. Pyruvat mit Hilfe eines Multienzymkomplexes (3-7 MDa), wobei  $NAD^+$  als Elektronenakzeptor fungiert. *H. salinarum* nutzt für diese Reaktion ein kleineres Enzym (200-300 kDa), die Oxosäure:Ferredoxin Oxidoreduktase. Ebenso wie im Multienzymkomplex entstehen Acylthioester aus den Oxosäuren.

Zwar ist Thiaminpyrophosphat (TPP) ebenso wie im Multienzymkomplex als Kofaktor beteiligt, aber die Redoxreaktion wird nicht durch Liponamid katalysiert. Statt dessen folgt auf die Decarboxylierung des Hydroxyalkyl-Thiamin-Pyrophosphats der erste von zwei  $1-e^-$  Elektronentransferprozessen, bei denen jeweils ein Elektron auf den 4Fe-4S-Cluster der Oxosäure:Ferredoxin Oxidoreduktase übertragen wird. Der Komplex des Enzyms mit dem Radikal ist stabil, ebenso wie das durch HsFdx anschließend reoxidierte Intermediat. Erst die Übertragung der Acylgruppe auf das CoenzymA führt zur Übertragung des radikalischen Elektrons auf den 4Fe-4S-Cluster.

Auch anaerobe Bakterien, die Fermentation und Photosynthese betreiben, besitzen die kleinere 2-Oxosäure:Ferredoxin Oxidoreduktase (Kerscher et al., 1982). Das Enzym enthält

genauso wie die Ferredoxine einen Eisen-Schwefel-Komplex, allerdings handelt es sich in diesem Fall um einen 4Fe-4S-Cluster. Wächtershäuser stellte 1992 die Hypothese des chemotrophen Ursprungs des Lebens an der Oberfläche von Pyrit auf (Wächtershäuser, 1992). Er untermauerte diese Vermutung mit der Beobachtung, dass eine Vielzahl von Eisen-Schwefel-Proteinen an zentralen Stoffwechselumsetzungen beteiligt sind. Die Enzyme könnten durch den Einbau von anorganischen Eisen-Schwefel-Komplexen in die Polypeptide an der Pyrit-Oberfläche zustande gekommen sein.

## 1.5 Zielsetzung

Im Rahmen dieser Dissertation soll der Einfluß der stark negativ geladenen Extra-Domäne des Ferredoxins aus *H. salinarum* auf das halophile Verhalten des Proteins untersucht werden. Zu diesem Zweck wurde zunächst die Stabilität von HsFdx in Abhängigkeit von der NaCl Konzentration untersucht, um sicherzustellen, dass es sich um ein halophiles Protein handelt und nicht um ein halotolerantes.

Die Halophilie ist ein Phänomen, das auf die Wechselwirkung des Proteins mit Wassermolekülen und Ionen in der Lösung zurückzuführen ist. Bei den wenigen bisher bekannten Strukturen von halophilen Proteinen handelt es sich ausschließlich um Kristallstrukturen. Damit Effekte in Lösung gemessen werden können, die auf die Salzkonzentration zurückzuführen sind, sollte mit Hilfe der NMR-Spektroskopie die Struktur des HsFdx in Lösung aufgeklärt werden.

Ausgehend von diesen NMR-Daten ist es möglich, verschiedene dynamische Aspekte zu untersuchen. Zum einen kann die zeitabhängige Denaturierung des HsFdx anhand der Intensität der NMR-Resonanzen verfolgt werden. Dies gibt Aufschluß darüber, ob die saure Domäne nahe des N-Terminus rascher zerfällt als die restlichen Sekundärstrukturelemente. Zum anderen bietet die Bestimmung der Aminosäure-Flexibilitäten in Lösung die Möglichkeit, die Dynamik von Resten in verschiedenen Bereichen des halophilen Proteins zu ermitteln und zu vergleichen.

Durch gezielte Deletion der Insertion sollen Mutanten des HsFdx hergestellt werden, denen diese typisch halophile Domäne fehlt. Die zwei Helices  $\alpha'$  und  $\alpha''$ , welche die Faltblätter  $\beta_1$  und  $\beta_2$  verbinden, sollen durch einen Loop bzw. einen Turn ersetzt werden. Diese Strukturelemente nehmen in Plazentypferredoxinen den Platz der beiden Helices ein. Der Einfluß der Extra-Domäne kann durch den direkten Vergleich der halophilen Eigenschaften des HsFdx und der Mutanten untersucht werden. Auch die Expressionseffizienz der Mutanten bei der homologen Expression in *H. salinarum* und die heterologe Expression im mesophilen Organismus *E. coli* können Hinweise auf die Halophilie der Proteine geben.

Des weiteren sollen Faltungsversuche am HsFdx und seinen Mutanten durchgeführt werden. Zu diesem Zweck müssen Rekonstitutionsprotokolle etabliert werden, da die Entfaltung von Ferredoxinen aufgrund des Zerfalls des Eisen-Schwefel-Clusters kein reversibler Prozeß ist.

Außerdem soll ein bisher nicht bekanntes Ferredoxins aus *H. volcanii* isoliert werden. Dieser moderat halophile Organismus zeigt Unterschiede im Glykosylierungsmuster der Glykolipide der Membran im Vergleich zu *H. salinarum* (Mengele & Sumper, 1992). In *H. volcanii* werden nur neutrale Oligosaccharide synthetisiert, während in *H. salinarum* Glucosereste durch Glucuronsäure ersetzt sind. In dem Zusammenhang soll untersucht werden, ob ein „moderat-halophiles“ Ferredoxin existiert und ob Strukturmerkmale identifiziert werden können, die für die graduelle Zunahme der Halophilie eines Proteins verantwortlich sind.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Bakterienstämme

*E. coli* Stämme für die Plasmidreplikation:

**XL1-Blue** (Bullock et al, 1987) *E. coli* K12 Sicherheitsstamm

Sup E44, hsdR17, recA1, gyrAS46, thi.1, relA1, lac<sup>-</sup>, [F<sup>+</sup>proAB<sup>+</sup>, lacI<sup>q</sup>lacZΔM15, Tn10(tet<sup>r</sup>)]

**DH5α** (Gibco-BRL)

F<sup>-</sup>endA1, hsdR17, supE44, thi-1, recA1, gyrA96, relA1, o80dlacZ M15

*E. coli* Stamm für die Expression:

**BL21(DE3)-RIL** (Studier & Moffat, 1986) *E. coli* B Sicherheitsstamm

F<sup>-</sup>ompT hsdS(r<sub>B</sub><sup>-</sup>m<sub>B</sub><sup>-</sup>) dcm<sup>+</sup> Tet<sup>r</sup> gal λ(DE3) endA Hte [argU ileY leuW Cam<sup>r</sup>]

*H. salinarum*

**S9** (Wagner et al., 1981)

BR<sup>++</sup>, HR<sup>+</sup>, SRI<sup>+</sup>, SRII<sup>+</sup>, Car<sup>-</sup>, Ret<sup>+</sup>

**SNOB** (Pfeiffer et al. 1999)

BR<sup>-</sup>, HR<sup>+</sup>, SRI<sup>+</sup>, SRII<sup>+</sup>, Car<sup>-</sup>, Rub<sup>-</sup>, Ret<sup>+</sup>

*Haloferax volcanii*

**WR340** (M. Mevarech, unveröffentlicht)

Histidin-auxotrophe Mutante des *H. volcanii* WFD11, abgeleitet von *H. volcanii* DS2 durch Entfernen des Plasmids pHV2 (Charlesbois et al., 1991).

#### 2.1.2 Vektoren

pBPH-M

Bei dem pBPH-M-Vektor handelt es sich um einen Shuttle-Vektor, der eine Ampicillinresistenz für die Selektion in *E. coli* enthält und eine Mevinolinresistenz für die



Selektion in *H. salinarum*. Für die Expression eines Proteins in *H. salinarum* besitzt der Vektor den Bacteriorhodopsinpromotor, welcher erst bei Sauerstoffmangel zu Beginn der logarithmischen Wachstumsphase angeschaltet wird.

#### pHus-BrFus

Dieser Vektor ist ebenso wie pBPH-M ein Shuttle Vektor und besitzt dieselben Resistenzen. Er enthält die Bacteriorhodopsinsequenz unter der Kontrolle des Bacteriorhodopsinpromotors. Eine Multiple-Cloning-Site am 3'-Ende von BR vor dem Stop-Codon ermöglicht die Herstellung von Fusionsproteinen, die über ihren N-Terminus an BR gebunden sind. Zwischen dem C-Terminus des BR und N-Terminus des Fusionsproteins befindet sich die Erkennungssequenz für den Faktor Xa, damit das Fusionsprotein nach der Aufreinigung vom BR getrennt werden kann.

#### pET-36b (Novagen)

Der pET-36b Vektor besitzt eine Kanamycinresistenz für die Selektion in *E. coli*. Die Induktion der Expression in *E. coli* steht unter der Kontrolle des lac Operons und wird durch Zugabe von IPTG zum Medium induziert.

#### pGEX-4T.1 (Pharmacia Biotech)

Der Vektor besitzt eine Ampicillinresistenz für die Selektion in *E. coli*. Die Induktion des GST-Fusionsproteins in *E. coli* steht unter der Kontrolle des lac Operons. An das GST schließt sich C-terminal eine Thrombinschnittstelle an, die eine Trennung des Proteins vom GST ermöglicht.

### 2.1.3 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden mit einem automatischen DNA-Synthesegerät (Applied Biosystems 380B) nach der Phosphoamidit-Methode hergestellt. Die Restriktionsschnittstellen in den Klonierungsprimern und die mutagenisierten Codons in den Mutageneseprimern sind unterstrichen.

Klonierungsprimer:

WT-Fdx-His (pBPH-M Vektor / Snob)

P1NH: 5'-TTTCATATGCCGACGGTAGAATAC (Nde1)

P5ThrHis: 5'-TTTGCATGCCCGAGCCGCGCGGGACGAGGATGACGCGGTTCTGCAG  
(SphI)

WT-Fdx (pET-36b Vektor / BL21(DE3)RIL)

hsfdxg.1.for: 5'-CTAGCTAGTCTAGAAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGA  
GATATACATATGCCGACGGTAGAATACCTCAACTACGAA (XbaI)

hsfdxg.1.rev: 5'-

CCGTCCGCTCGAGTCATCAGATGACGCGGTTCTGCAGGTAGTCGAG (XhoI)

GST-Fusionsprotein (pGEX-4T.1 Vektor / BL21(DE3)RIL)

Fdx-Bam-NH: 5'- CGCGGATCCCCGACGGTAGAATAC (BamHI)

hsfdxg.1.rev: 5'-

CCGTCCGCTCGAGTCATCAGATGACGCGGTTCTGCAGGTAGTCGAG (XhoI)

Ferredoxinpromotor (pBPH-M Vektor / Snob)

5FerProm: 5'-TTTTTTGGTACCGTCGACGGCCGGCAGCACCTGAACG (Asp718)

3FerProm: 5'-GGAATTCCCATATGCACTGCAGAGTTCGGCTTCCGAACG (NdeI)

Mutageneseprimer für *H. salinarum* Ferredoxin:

hsfdx.1b.for: 5'- CTAGCTAGTCTAGAAATTTTGTTTAAC (XbaI)

Fdxana

Fdx-ana-54: 5'- AACgaagccgagggcagcTACGGCACGATGGAGGTCGCGGAGGGCGAG

Fdx-ana-34: 5'- GTAcgtgccctcggttcGTTGAGGTATTCTACCGTCGGCATATG

Fdxequi

Fdxequi.for: 5'- CTCacgccgtccggcTACGGCACGATGGAGGTCGCGGAGGGCGAG

Fdxequi.rev: 5'- GTagccggacggcgtGAGGTATTCTACCGTCGGCATATG

Sequenzierungsprimer:

pBPHM5529.seq: 5'-CATGATTACGCCAAGCTCGGAATTAACC

pBPHM100.rev: 5'-GCAACAGATTGATCACGCGGCCCATGC

chey.for: 5'- TTTCATATGGCGAAGCAGGTCTTACTG

chey.rev: 5'-CCGCTCGAGTCATCATGCGGTGAGCACGTCCGA

T7-Terminator+: 5'- CTAGTTATTGCTCAGCGGTGG

hvolc.for: 5'- CGCCGAAGACTACGGTGAGATGGAAGTGAA

hvolc.rev: 5'- TTCACTTCCATCTCACCGTAGTCTTCGGCG

5'-Fdxmarc: 5'- ATGCCGACGGTAACGTACCTCAACTA

3'- Fdxmarc: 5'- TCAGATGACGCGGTTCTGCAGGTA

5'- marc: 5'- ATGCC5AC5GT5TAYCT5AAYTA

3' - marc: 5' - TCA5AT5AC5CGRTTYTG5AGRTA

## 2.1.4 Herstellerfirmen der verwendeten Geräte und Chemikalien

### 2.1.4.1 Chemikalien und Enzyme

Die verwendeten Chemikalien hatten die Qualitätsstufe "zur Analyse". Sie wurden größtenteils von den Firmen Merck (Darmstadt) und Sigma (München) bezogen.

Ausnahmen werden im folgenden aufgeführt:

<u>Chemikalien</u>	<u>Hersteller</u>
Agarose	Biozym (Oldendorf)
AgNO <sub>3</sub>	Riedel-de Haën
Bacto-Agar	Difco (Detroit, USA)
Bacto-Trypton	Difco (Detroit, USA)
Bromphenolblau	Serva Feinbiochemica (Heidelberg)
Coomassie Brilliantblau R-250	Serva Feinbiochemica (Heidelberg)
Desoxyribonukleotide (dNTPs)	Pharmacia (Freiburg)
DNA-Längenstandards	Boehringer Mannheim GmbH
DNA-Ligase, T4	New England Biolabs (Beverley, USA)
Ethanol	Riedel-de Haën
Ethidiumbromid	Boehringer Mannheim GmbH
Hefe-Extract	Difco (Detroit, USA)
His-Tag-Antikörper dia900 (Maus IgG1)	Dianova
IPTG	Gerbu
Methanol	Riedel-de Haën
Molekulargewichtsstandard	New England Biolabs (Beverley, USA)
Protein Marker Broad Range,	
Prestained Protein Marker	
Natriumdodecylsulfat	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Proteaseinhibitorcocktailtabletten,EDTA frei	Roche Diagnostics
Protogel-Lösung	National Diagnostics
TaqaraLaTaq	Takara
"Taq Dye Deoxy <sup>TM</sup> Terminator	Applied Biosystems (Weiterstadt)
Cycle Sequencing Kit"	

Tetramethylethylendiamin (TEMED)  
Triton X-100

Serva Feinbiochemica (Heidelberg)  
Serva Feinbiochemica (Heidelberg)

### 2.1.5 Geräte

Agarose-Gelelektrophoresekammern  
Martinsried ÄKTApurifier 100  
Blot-Apparatur Trans-Blot SD  
DNA-Robocycler  
French Pressure Cell Press  
  
FPLC Station LCC-501  
Fraktionssammler  
MonoQ HR 5/5 Anionenaustauschersäule  
Peristaltik-Pumpe Minipuls  
Photometer Ultrospec 3000  
Quarzküvetten  
Tischzentrifuge  
UV/VIS Spektralphotometer  
UV/VIS Spektralphotometer Lambda 2  
PD-10 Desalting Columns  
Q-Sepharose Fast Flow  
ResourceQ Anionenaustauschersäule  
SDS-Gelgießkammer SE215 Mighty Small  
Sephacrose-4B  
Multiple Gel Caster  
  
SDS-Gellaufkammer SE250 Mighty Small II  
Ultrazentrifuge TGA-65  
mit den Rotoren Ti45, TFT  
Zentrifuge RC5C  
mit den Rotoren SS34, GS3, SLA3000

Eigenbau des MPI f. Biochemie,  
Pharmacia Biotech  
BioRad  
Stratagene  
Aminco SLM Instruments Inc.,  
Urbana, USA  
Pharmacia Biotech  
Pharmacia Biotech  
Pharmacia Biotech  
Abimed  
Pharmacia Biotech  
Hellma  
Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH  
Aminco  
Perkin Elmer GmbH  
Pharmacia Biotech  
Pharmacia Biotech  
Pharmacia Biotech  
Pharmacia Biotech  
Pharmacia Biotech  
Eigenbau des MPI  
für Biochemie, Martinsried  
Hoefer / Pharmacia Biotech  
Kontron  
  
Sorvall

Des weiteren verwendete Geräte und Materialien sind bei den jeweiligen Methoden aufgeführt.

### 2.1.6 Stammlösungen, Medien und Puffer

Medien und Puffer werden unter den jeweiligen Methoden beschrieben.

## 2.2 Mikrobiologische und Molekularbiologische Methoden

### 2.2.1 Propagierung und Aufbewahrung von *E. coli*

*E. coli* Zellen wurden entweder in LB oder TB Medium inokuliert. Für „über Nacht“(üN)-Kulturen wurden 35 ml Medium angeimpft und bei 37 °C bei 250 rpm geschüttelt. Bakterienkolonien auf Agarplatten können einige Tage verwendet werden. Für eine längere Aufbewahrung wurden Aliquots von üN-Kulturen mit derselben Menge an Glycerin versetzt und bei –20°C gelagert.

Medium für *Escherischia coli*:

LB(Luria-Bertani)-Medium

10 g Bacto-Trypton  
5 g Bacto-Yeast  
10 g NaCl  
ad 1l H<sub>2</sub>O  
mit NaOH auf pH 7.0-7.2 einstellen, autoklavieren

TB(Terrific Broth)-Medium

12 g Bacto-Trypton  
24 g Bacto-Yeast  
4 ml (ca. 5.7 g 87%) Glycerin  
ad 900ml H<sub>2</sub>O, autoklavieren  
mit 100 ml autoklaviertem Kaliumphosphatpuffer auf pH 7.5 bringen:  
0.17 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (23.14g/l)  
0.72 K<sub>2</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>×3 H<sub>2</sub>O (164.33 g/l)

Antibiotika werden wir folgt eingesetzt:

Ampicillin 100 µg/ml (100 mg/ml Stammlösung)

Kanamycin 30 µg/ml (30 mg/ml Stammlösung)

Chloramphenicol 34 µg/ml (34mg/ml Stammlösung)

### 2.2.2 Propagierung und Aufbewahrung von Halobakterien

Für die Anzucht von *H. salinarum* und *H. volcanii* Zellen wurden 35 ml Halostandardmedium entweder von Platte oder mit 1 ml Flüssigkultur angeimpft und bei 37°C und 100 rpm geschüttelt. Das Überimpfen erfolgte im Verhältnis 1:20 in eine 700 ml Hauptkultur.

Eine stationäre 5-7 Tagekultur kann bei Raumtemperatur luftdicht verschlossen gelagert werden. Außerdem können 50 ml einer  $10^6$ - $10^7$  fachen Verdünnung ausplattiert werden und die nach 8- bis 14-tägiger Inkubation bei 40°C erhaltenen Einzelkolonien bei Raumtemperatur aufbewahrt werden.

Medium für *Halobacterium salinarum*:

Halostandardmedium (Oesterhelt & Krippahl, 1983)

4.3 M NaCl	250 g
80 mM MgSO <sub>4</sub> ·7 H <sub>2</sub> O	20g
27 mM KCl	2g
10 mM Na <sub>3</sub> Citrat	3g
Bacto-Pepton	10g
H <sub>2</sub> O	ad 1 l

mit NaOH auf pH 7.0-7.2 einstellen, autoklavieren

für Platten + 15g Agar

Medium für *Haloferax volcanii* (Mevarech & Werczberger, 1985):

NaCl	206 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	36 g
MnCl <sub>2</sub> (75mg/l)	1.7 ml
1 M Tris/HCl pH 8.0	500 ml

KCl	3.7 g
CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O(10%w/v)	5 ml
H <sub>2</sub> O	ad 900 ml

Getrennt autoklavieren und 100 ml der folgenden, autoklavierten Lösung zugeben:

Bacto-Yeast	3% w/v
Bacto-Tryptone	5% w/v

### 2.2.3 Präparation elektrokompetenter *E. coli* Zellen

Für die Herstellung elektrokompetenter *E. coli* Zellen werden üN-Kulturen der entsprechenden *E. coli* Stämme in LB-Medium mit dem jeweils erforderlichen Antibiotikum bei 37 °C, 250 rpm herangezogen. Dann wird im Verhältnis 1:100 in 500 ml frisches Medium überimpft und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0.5 weiter inkubiert. Anschließend werden die Zellen 30 min bei 4°C gekühlt und dann abzentrifugiert (20 min, 4°C, 4000rpm/GS3-Rotor).

Alle folgende Schritte werden auf Eis gekühlt durchgeführt. Der Überstand wird möglichst vollständig abgenommen und die Zellen zunächst in 500 ml, dann nach weiteren Zentrifugationsschritten wie oben in 250 ml und abschließend in 50 ml eiskaltem 10% v/v Glycerin vorsichtig resuspendiert. Nach einem letzten Zentrifugationsschritt wird das Pellet in 150 µl 10% v/v Glycerin aufgenommen und in 70 µl Portionen aliquotiert. Die Zellsuspension wird in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei –80°C gelagert.

### 2.2.4 Transformation elektrokompetenter *E. coli* Zellen

Die elektrokompetenten Zellen werden auf Eis aufgetaut und 35 µl Zellsuspension mit 0.5 µl (Plasmidpräparation) bis 5 µl (Ligationsansatz) DNA-Lösung versetzt und 10 min auf Eis gekühlt. Die Transformationsküvette wird ebenfalls 10 min auf Eis vorgekühlt und die Mischung anschliessend hineingegeben und noch einmal 10 min auf Eis gelagert.

Die Kontaktstellen der Küvette werden sorgfältig getrocknet und die Küvette in das Elektroporationsgerät (Gene Pulser von Biorad) gestellt. Ein Puls mit 25 µF, 1500 V und 800 Ω wird auf die Zellen gegeben, die sofort danach in 1 ml LB Medium suspendiert werden. Der Ansatz wird für 45 min bei 37°C inkubiert und dann werden Verdünnungen der Zellsuspension auf Platten mit adäquater Antibiotika ausplattiert und über Nacht bei 37° inkubiert.

### 2.2.5 Präparation kompetenter *H. salinarum* Zellen und Transformation

Für die Herstellung kompetenter *H. salinarum* Zellen wurde eine 35 ml Kultur SNOB genommen, die mindestens dreimal alle zwei Tage überimpft wurde. Nach 1 ½ Tagen Wachstum wurden 2 ml Kultur abgenommen und 5 min bei 5000 rpm abzentrifugiert und der Überstand abgenommen. Die Zellen werden in 200 µl sterilem SPH Puffer durch leichtes Schwenken des Eppendorfgefäßes resuspendiert. Durch Zugabe von 10 µl 0.5 M EDTA in SPH Puffer werden Sphäroplasten erzeugt, deren Ausbildung im Mikroskop verfolgt wird.

Von der Plasmid-DNA werden 5-10 µl mit derselben Menge 4M NaCl gemischt und zu der Sphäroplastenlösung gegeben. Es wird vorsichtig gemischt und für 10 min bei RT inkubiert. Anschliessend werden 220 µl 60% PEG<sub>600</sub> in SPH-Puffer in den Deckel des Eppendorfgefäßes pipettiert und nach Schliessen des Deckels wird durch Schwenken gemischt.

Das Eppendorfgefäß wird mit SVL Puffer aufgefüllt. Bei 4000 rpm wird 5 min bei RT zentrifugiert und anschliessend der Überstand abgenommen.

Das Pellet wird in 3 ml Halomedium aufgenommen und bei 37°C ÜN gerollt. Die Halokultur wird in 50-200 µl Aliquots auf Platten mit 10 µg/ml Mevinolin ausplattiert. Ausserdem wird mit 1 ml der Übernachtskultur 35 ml Halomedium mit Mevinolin angeimpft, wovon nach drei Tagen Platten ausgestrichen werden.

#### SPH(Sphäroplastenpräparations)- Puffer

- 2 M NaCl
- 25 mM KCl
- 50 mM Tris/HCl pH 8.75
- 15% w/v Sucrose
- H<sub>2</sub>O

#### SVL(Sphäroplastenverdünnungs)- Puffer

- 4.3 M NaCl
- 80 mM MgCl<sub>2</sub>
- 10 mM Na<sub>3</sub>Citrat
- 1.4 mM CaCl<sub>2</sub>
- 50 mM Tris/HCl pH 7.4



15% Sucrose

H<sub>2</sub>O

### 2.2.6 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E.coli*

Für die Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* werden 3 ml üN-Kulturen in LB Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum bei 37°C und 250 rpm hochgeschüttelt und bei 4000×g für 20 min abzentrifugiert. Die anschließende Isolierung erfolgt mit dem Plasmid-Mini-Kit der Firma Qiagen, bei dem die Zellen durch alkalische Lyse aufgeschlossen werden und die Plasmid-DNA mittels hydrophober Interaktionschromatographie von der genomischen DNA und den übrigen Zellbestandteilen getrennt wird. Die Ausbeute dieser Methode liegt bei 2-10 µg Plasmid-DNA.

### 2.2.7 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die DNA-Konzentration wurde in einem Volumen von 10 µl im Photometer über die Absorption bei 260 nm bestimmt. Die Reinheit der DNA wurde über das A<sub>260nm</sub>/A<sub>280nm</sub> Verhältnis bestimmt. Die Konzentration ergibt sich aus:

$$cDNA[\mu\text{l/ml}] = A_{260\text{nm}} \times \text{Verdünnung} \times 50$$

### 2.2.8 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR-Reaktionen wurden in einem Robocycler der Firma Stratagene durchgeführt. Für die Ansätze wurde die Polymerase TakaraLaTaq der Firma Takara verwendet.

PCR-Standardansatz:

100 ng Template DNA	x µl
Primer A/B (ca. 10 pmol/µl) je	2 µl
10mal TakaraLaTaq Puffer	5 µl
dNTP's (je 25 mM)	8 µl
auf 50 µl mit bidest. H <sub>2</sub> O auffüllen.	

Falls genomische DNA als Template DNA eingesetzt wird, so wird vor Zugabe der Polymerase (0.5 µl) für 3 min auf 96°C erhitzt. Im Anschluß wird folgender Zyklus durchlaufen:

Aufschmelzen: 96°C; 30 sec  
Hybridisierung:  $T_m$ ; 30 sec  
Elongation: 72°C; 1 sec/ 10-15 bp

Die Hybridisierungstemperatur  $T_m$  berechnet sich näherungsweise aus der Länge und der Sequenz der Primer:

$$T_m = [(G/C) \times 4^\circ\text{C} + (A/T) \times 2^\circ\text{C}] - 5^\circ\text{C}$$

### 2.2.9 Gelelektrophorese von DNA

Für die DNA-Gelelektrophorese wird 1-1.5% w/v Agarose in 1×TAE durch Aufkochen in der Mikrowelle gelöst. Nachdem die Lösung etwas abgekühlt ist, wird eine 10 mg/ml Ethidiumbromidlösung in einer 1/20000 Verdünnung zugegeben und die Gellösung in eine horizontale Gelkammer gegossen. Wenn das Gel fest geworden ist, wird es mit 1×TAE überschichtet und die Geltaschen mit Proben und Grössenstandards in 6×DNA-Probenpuffer beladen. Bei 50-80V werden die DNA-Fragmente nach ihrer Grösse getrennt und die DNA-Banden bei 312 nm in einem UV-Transilluminator detektiert.

50×TAE-Puffer für die DNA-Gelelektrophorese:

242 g Tris  
47.1 ml Essigsäure  
37.2 g EDTA  
H<sub>2</sub>O ad 1l

Es wurde Seakem LE Agarose von FMC BioProducts vertrieben durch Biozym verwendet.

6×DNA-Probenpuffer für DNA-Agarosegele:

Saccharose 50% w/v  
EDTA 0.1 mM  
Bromphenolblau 0.1%  
SDS 0.1%

mit NaOH oder HAc den pH 7.0 einstellen

### 2.2.10 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Isolierung von PCR-Produkten und Restriktionsfragmenten aus Agarosegelen erfolgt mit Hilfe des QIAquick-Gel-Extraction-Kits der Firma Qiagen unter Anwendung des von der Firma angegebenen Protokolls.

### 2.2.11 Isolierung von genomischer DNA aus *H. salinarum* und *H. volcanii*

Eine Schnellisolierung kann durch Pelletieren von 2 ml Halokultur und anschliessendes Resuspendieren in 1 ml H<sub>2</sub>O erfolgen. Das Zellysatz kann direkt für eine PCR eingesetzt werden.

Für eine saubere DNA Präparation werden 2 ml einer frisch gewachsenen Kultur von *H. salinarum* (OD<sub>600</sub> ungefähr 1.0) abzentrifugiert und der Überstand abgegossen (Für die Isolierung der genomischen DNA aus *H. volcanii* wurden 1 Tages Kulturen verwendet). Das Pellet wird in 400 µl Lysepuffer resuspendiert und mit 800 µl Ethanol überschichtet. Die DNA befindet sich in der Interphase und kann auf eine 10 µl Glaskapillare aufgerollt werden. Die beiden Phasen werden gemischt und die Kapillare mit der DNA in dem Gefäss für 7 min stehen gelassen. Die Kapillare wird daraufhin für 10 min in Ethanol gestellt und dann für ein paar Sekunden in Ether getaucht. Abschliessend wird die DNA auf der Kapillare für mindestens 20 min an der Luft getrocknet und danach in Wasser gelöst.

Lysepuffer

4 M NaCl	2.5 ml
2 M Tris pH 8.0	0.5 ml
0.5 mM EDTA	0.2 ml
10 % w/v SDS	0.5 ml
H <sub>2</sub> O	ad 100 ml

### 2.2.12 Restriktionsverdau von DNA

Für den Restriktionsverdau wurden ca. 0.05 µg/ml DNA eingesetzt, bzw. 0.1 µg/ml aus Halobakterien isolierte genomische DNA. Für einen 50 µl Ansatz wurden 10 U des jeweiligen Enzyms mit dem zugehörigen Puffer zugegeben und bei der für das Enzym vom Hersteller vorgesehenen Temperatur die angegebene Zeit inkubiert (zwischen 1½ bis 2 h bei 30-37°C, Verdau der genomischen DNA über Nacht).

### 2.2.13 Ligation von DNA-Fragmenten

Für einen Ligationsansatz wurden 30 µl von dem PCR Fragment (Insert) verdaut und anschliessend über das PCR-Purification Kit der Firma Qiagen aufgereinigt. Der zugehörige Vektor wurde nach dem Schneiden aus einem Agarosegel isoliert. Ein typischer Ligationsansatz hatte folgende Zusammensetzung:

Insert	10 µl
Vektor	2 µl
T4-Ligase	1 µl
5× T4-Ligasepuffer	3.5 µl
ATP-Lösung	1 µl

### 2.2.14 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung der DNA erfolgte nach der Kettenabbruchmethode durch PCR mit fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotiden unter Gebrauch des *BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kits* von Perkin-Elmer Applied Biosystems.

Reaktionsansatz:

Plasmid	5 µl (500 ng)
Primer	1 µl (5-10 pmol)
Kit	3 µl
ad H <sub>2</sub> O 10-14 µl.	

PCR-Bedingungen:

30 s	96°C
30 s	T <sub>m</sub> (primerspezifische Hybridisierungstemperatur)
4 min	60°C

30-35 Zyklen

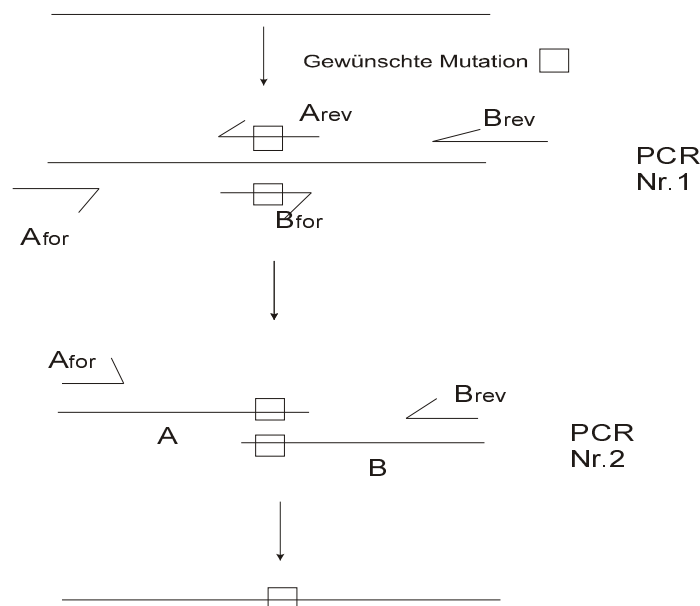
Zu dem PCR Ansatz werden 10 µl H<sub>2</sub>O zugegeben. Die Probe wird durch Gelfiltration über ein Micro-Spin G-50 Säulchen von Pharmacia nach Angaben des Herstellers aufgereinigt und anschliessend in einer Vakuumzentrifuge (Speed Vac Concentrator) trocken gezogen. Die

Sequenzierung erfolgt per Gelelektrophorese in einem DNA-Sequenzierer (Modell 373A von Applied Biosystem).

Bei der PCR entstehen aufgrund der als Terminatoren fungierenden Dideoxynukleotide Fragmente unterschiedlicher Kettenlänge. Jedes Dideoxy-dNTP ist an einen anderen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt, anhand dessen die DNA-Sequenz des Templates bestimmt werden kann.

### 2.2.15 Ortsspezifische Mutagenese nach der Zwei-Schritt-PCR-Methode

Die Einführung ortsspezifischer Punktmutationen erfolgt nach der Zwei-Schritt-PCR-Methode (Ho et al., 1989). Es werden für jede Mutation zwei Primer A und B entworfen, die jeweils zueinander komplementär die gewünschte Mutation codieren und zusätzlich 20-30 flankierende Basen enthalten. Zusammen mit dem 5'- und dem 3'- Primer für das zu mutierende Gen werden zwei PCR Ansätze gemacht, die jeweils einen Teil des mutierten Gens liefern:



Diese werden in einer anschliessenden PCR Reaktion fusioniert (in einem 50 µl Ansatz wurden je 0.5 µl der PCR-Produkte eingesetzt) und mit Hilfe der terminalen Primer das mutierte Genfragment gewonnen. Über die entsprechenden Restriktionsschnittstellen kann es dann in den gewünschten Expressionsvektor kloniert werden.

### 2.2.16 Herstellung der Genfragmente für die Mutanten Fdxana und Fdxequi

Zuerst wurden die jeweiligen Expressionsplasmide für HsFdx erstellt. Das für HsFdx kodierende Genfragment wurde aus dem Cosmid RI45 amplifiziert. Ausgehend davon konnten durch Oligonukleotid-gerichtete Mutagenese Genfragmente mit den erwünschten Deletionen hergestellt werden.

HsFdx                                      1-L(6)- [ 7-36 ]-Y(37)-128

↓

*Anabaena* Fdx                                      ....-NEAEGT-.....

⇒                                      Fdxana

HsFdx                                      1-L(6)- [ 7-36 ]- Y(37)-128

↓

*Equisetum arvense* Fdx                                      ....-TPSG-.....

⇒                                      Fdxequi

## 2.3 Proteinchemische Methoden

### 2.3.1 SDS-Gelelektrophorese

Um Proteine nach ihrer Größe im elektrischen Feld auftrennen zu können, werden sie mit dem Detergenz Natriumdodecylsulfat(SDS) denaturiert, wobei ein negativ geladener Protein-SDS-Komplex entsteht (an 1 g Protein bindet ungefähr 1 g SDS). Als Matrix für die Größentrennung wird Acrylamid eingesetzt, welches beim Auspolymerisieren mit dem Quervernetzer Methylenbisacrylamid ein Gel ausbildet. Für die Polymerisation werden Ammoniumpersulfat (APS) und N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED) als Radikalstarter verwendet. Der Anteil an Acrylamid bestimmt die Porengröße des Gels und damit seinen Trennungsbereich.

Um eine bessere Auftrennung der Proteine zu erreichen, wird über das Trenngel (pH 8.8) ein Sammelgel (pH 6.8) geschichtet, damit die ins Gel einlaufenden Banden möglichst schmal sind.

Die SDS-Gelelektrophorese wurde nach der Methode von Fling & Gregerson (Fling & Gregerson, 1986) mit Biorad Minigelapparaturen durchgeführt. Es wurden 15% und 12.5% Gele verwendet.

Für 10 Trenngele à 15%

- 15.6 ml H<sub>2</sub>O
- 9.5 ml Tris (2 M pH 8.8)
- 500 µl SDS (10% w/v)
- 26 ml Protogel (30% Acrylamid)
- 750 µl APS
- 60 µl TEMED

Für 5 Trenngele à 12.5%

- 10.5 ml H<sub>2</sub>O
- 4.75 ml Tris (2 M pH 8.8)
- 250 µl SDS (10% w/v)
- 10.8 ml Protogel (30% Acrylamid)
- 375 µl APS
- 30 µl TEMED

Für 10 Sammelgele à 12.5%

- 12.4 ml H<sub>2</sub>O
- 4.8 ml Tris (1 M pH 6.8)
- 400 µl SDS (10% w/v)
- 4 ml Protogel (30% w/v Acrylamid)
- 300 µl APS
- 30 µl TEMED

Die Proteinproben werden mit Lämmli-puffer versetzt und 1-2 min bei 95°C gekocht. Gesamtzelllysatsproben werden ½ Stunde auf 95°C erhitzt.

2×Lämmli-puffer

0.5 M Tris/HCl pH 6.8	1 ml
H <sub>2</sub> O	3.2 ml
50% Glycerin	1.6 ml
10% SDS	1.6 ml
0.15% Bromphenolblau	0.2 ml

Laufpuffer

25 mM Tris
250 mM Glycin/HCl
0.1% w/v SDS

Das Gel wird anfänglich bei 80 mV für den Einlauf der Proben ins Sammelgel gefahren. Für das Trenngel wird die Spannung auf 120 mV hochgesetzt.

### 2.3.2 Färben von SDS-Gelen

Die Färbung der Proteinbanden im Gel erfolgte mit Coomassie Brilliant Blue R-250. Der Farbstoff lagert sich an die Argininreste der Proteine an, die bis zu einer Konzentration von 0.1 µg pro Bande detektiert werden können. Für die Färbung wird das Gel 1 h bei RT in der Färbelösung geschwenkt.

Coomassie-Färbelösung

Coomassie	0.1% w/v
MeOH	450 ml
Essigsäure	100 ml
H <sub>2</sub> O	450 ml

1000 mg Coomassie R-250 werden ½-1 Stunde in 450 ml Methanol gerührt, um den Farbstoff zu lösen. Nach Zugabe von H<sub>2</sub>O und Essigsäure wird die fertige Lösung filtriert.

Das Entfärben des Gels erfolgt mit einer Lösung aus 125 ml Isopropanol, 100 ml Essigsäure und 775 ml H<sub>2</sub>O.



### 2.3.3 Western Blot

Proteine können von einem ungefärbten SDS-Gel durch das halbtrockene Blotverfahren auf eine Membran übertragen werden. Zu diesem Zweck wird die Blotmembran aus PVDF (Immobilon-P-Transfermembran, Millipore) 1 min lang in Methanol eingelegt. Gleichzeitig wird das Blotpapier (Whatmanpapier) zusammen mit dem Gel in Blot-Puffer geschwenkt, worin die Membran vor dem Aufbau des Blots ebenfalls kurz geschwenkt wird.

#### Blot-Puffer

- 25 mM Tris
- 192 mM Glycin
- 20% v/v MeOH
- pH-Wert 8.6 einstellen

Es wird ein Sandwich aufgebaut, das von unten begonnen aus einem Whatmanpapier, dem Gel, der Blotmembran und wieder einem Whatmanpapier besteht. Dieses Sandwich wird auf die Blotapparatur gelegt, wobei sich die Anode unten befindet und nach oben zur Kathode geblottet wird. Für das 14.6 kD Ferredoxin wurde eine Stromstärke von 50 mA pro Minigel und eine Blotzeit von 1 h 10 min gewählt.

Anschliessend wird die Membran mit 2.5-3% w/v BSA in TBST-Puffer für 1 h bei RT oder üN bei 4°C blockiert.

#### 10×TBST-Puffer

- 100 mM Tris/HCl pH 7.4
- 1.5 M NaCl
- 2% w/v TritonX-100

Die Lösung wird abgegossen und die Membran kurz mit TBST gewaschen. In 10 ml TBST werden 10 µl Anti-His-Antikörper (diese Lösung wird mehrfach verwendet und bei 4°C gelagert!) auf die Membran gegeben und 1-2 h bei RT oder bei 4°C üN inkubiert. Die Antikörperlösung wird abgegossen und dreimal kurz und dann dreimal je 10 min mit TBST-Puffer gewaschen. Die Sekundär-Antikörper (Peroxidase-konjugierter Antikörper HRP(Horseradish Peroxidase)-Protein A für den His-Antikörper 1:10000 und zusätzlich ein Anti-Biotin-Antikörper 1:1000 für den biotinylierten Marker) werden in 10 ml TBST-Puffer zur Membran gegeben und diese wird 1 h bei RT geschwenkt. Die Sekundär-

Antikörperlösung wird verworfen und die Membran wieder dreimal kurz und dreimal je 10 min mit TBST-Puffer gewaschen.

Die Entwicklung des Blots erfolgt durch eine enzymatische Chemilumineszenzreaktion mit einem ECL-Immunfärbungs-Kit von Amersham. Von Lösung A und B werden je 2.5 ml gemischt und dann zur Membran gegeben. Nach 1 min wird die Membran kurz auf ein Whatmanpapier gelegt, um überschüssige Reagenzlösung zu entfernen und in eine Klarsichtfolie gewickelt. Auf die Membran wird für 1 min ein Röntgenpapier gelegt und anschliessend entwickelt. Je nach Stärke des Signals wird die Einwirkzeit variiert, die Lumineszenz hält ca. 24 h an.

### **2.3.4 Proteinbestimmung nach Bradford und BCA-Methode**

Die schnellere Variante der Proteinbestimmung ist der Bradford Test. Er enthält den Farbstoff Coomassie Brilliantblau, welcher an die Arginin-Reste der Proteine bindet. Durch diese Reaktion wird der Farbstoff von der kationischen (Absorptionsmaximum bei 470 nm) in die anionische (Absorptionsmaximum bei 595 nm) Form umgewandelt.

Das Bradfordreagenz von Bio-Rad wird 1:5 mit Wasser verdünnt, und zu 1 ml dieser Lösung werden 10 µl Proteinlösung gegeben. Nach 5 min bei RT wird die Absorption bei 595 nm gemessen und die Konzentration über den Vergleich zur Eichkurve mit BSA bestimmt.

Eine andere Möglichkeit zur Quantifizierung von Proteinen ist die Farbreaktion mit Bichinolinsäure (BCA). Proteine bilden mit  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen in alkalischer Lösung einen Komplex (Biuret-Reaktion), wobei die  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen zu  $\text{Cu}^+$ -Ionen reduziert werden. Diese bilden mit der Bichinolinsäure einen violetten Farbkomplex aus, dessen Absorptionsmaximum bei 562 nm liegt.

Für den BCA Test von Pierce werden Lösung A und B im Verhältnis 50:1 zusammengegeben. Zu 1 ml der Mischung werden 50 µl der Proteinlösung pipettiert. Nach einer Inkubation bei 37°C für ½ Stunde wird die Absorption bei 562 nm gemessen und die Konzentration über den Vergleich zur Eichkurve mit BSA bestimmt.

Für die Eichkurven werden BSA Lösungen mit Konzentrationen von 50 µg/ml bis 1 mg/ml eingesetzt.

### 2.3.5 Aufkonzentrieren von Proteinen

Das Aufkonzentrieren und Umpuffern der Proteine erfolgt in Centricon 10 Konzentrationszellen (15 ml und 2 ml) von Amicon. Die Zentrifugation findet bei 4°C und höchstens 3000×g statt.

Proben für die NMR Messungen wurden auf eine Konzentration von etwa 1 mg/ml gebracht.

### 2.3.6 Proteinsequenzanalysen

Für die Proteinsequenzanalyse wird ein SDS-Gel, das eine Bande des zu identifizierenden Proteins enthält, auf eine PVDF-Membran geblottet. Der Blot wird 1 min mit einer frisch präparierten Coomassie Lösung gefärbt. Die Färbelösung wird abgegossen und der Blot kurz mit destilliertem Wasser gewaschen. Die Membran wird 2-5 min in Entfärbelösung geschwenkt, bis die Proteinbande gut zu erkennen ist, und kurz auf einem Whatmanpapier getrocknet. Aufbewahrt wird der Blot in Aluminiumfolie.

Die Proteinbande wurde aus der Membran ausgeschnitten. In der Arbeitsgruppe Proteinanalytik von Prof. Lottspeich wurde damit eine N-terminale Edman-Sequenzierung durchgeführt, über die bis zu 30 Aminosäuren vom N-Terminus bestimmt werden können.

Sollen längere Sequenzen eines Proteins bestimmt werden, so ist dies über unterschiedliche Spaltungen des Proteins möglich, so dass überlappende Sequenzen der Spaltprodukte bestimmt werden können.

#### Coomassie-Lösung

Coomassie Brilliant Blue R	0.1% w/v
Methanol	50 % v/v
Essigsäure	5% v/v

#### Entfärbelösung

Methanol	50 % v/v
Essigsäure	5% v/v

### 2.3.7 Massenspektrometrische Untersuchung von Proteinen

Für die Identifikation von Proteinen per Massenspektrometrie wurde die entsprechende Bande aus einem Coomassie gefärbten SDS-Gel ausgeschnitten, gelöst und mit Trypsin verdaut (Shevchenko, Wilm, Vorm & Mann, 1996). Die Cysteine wurden durch Behandlung mit Iodacetamid in Carboxyamidomethyl-Cystein umgewandelt und die Methionine in ihre Methioninsulfoxid-Form überführt. Die massenspektrometrische Untersuchung erfolgte in der Abteilung Proteinanalytik von Prof. Lottspeich an einem MALDI-Gerät (Matrix-Assisted-Laser-Desorption/Ionisation). Die spezifische Massenverteilung des verdauten Proteins erlaubte seine Identifizierung.

Die Bestimmung der spezifischen Masse von Proteinen erfolgte in der Abteilung von Prof. Moroder am ESI (Electron-Spray-Ionisation).

## 2.4 Markierung von Proteinen in *H. salinarum*

### 2.4.1 Herstellung von $^{15}\text{N}$ und $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ -markiertem Algenpepton

Um einheitlich markierte Proteine direkt aus den Halobakterien zu isolieren, werden *Scenedesmus obliquus* Algen  $^{15}\text{N}$  bzw.  $^{13}\text{C}$  markiert und durch ihre Hydrolyse die Aminosäuren für das Halomedium gewonnen. Als einzige Stickstoffquelle wird dem Algenmedium Ammoniumnitrat zugegeben, und als Kohlenstoffquelle wird Kohlendioxid genutzt.

Die Vorkulturen der Algen werden in luftdicht verschlossenen 250 ml-Doppelstockkolben gezogen, wobei sich im unteren Kolben ca. 50 ml  $\text{KHCO}_3$  (bzw.  $\text{KH}^{13}\text{CO}_3$ ) befindet, um das zum Wachstum notwendige Kohlendioxid zu liefern. 45-50 ml markiertes Algenmedium werden mit 4 ml Algenkultur inokuliert und bei 30 °C und 100 rpm unter Pflanzenlampen geschüttelt. Nach je 10-14 Tagen wird weitere zweimal je 1:12 überimpft. Ein 11 l Fermenter wird mit 250 ml Vorkultur inokuliert. Über eine  $\text{CO}_2$ -Flasche oder einen Kreislauf mit  $^{13}\text{CO}_2$  (Luftballon) wird der Fermenter mit Kohlendioxid versorgt.

Das Wachstum der Algen wird über die  $\text{OD}_{800}$  verfolgt (gemessen in 1/10 und 1/100 Verdünnung). Bei einer  $\text{OD}_{800}$  von 4 wird der Fermenterinhalt über einen Glasfaserfilter geerntet, wobei ein Zehntel des Inhaltes im Fermenter als Inokulum verbleibt und das filtrierte

Medium wieder in den Fermenter zurückgeleitet wird. Dies geschieht unter sterilen Bedingungen.

Die auf dem Glasfaserfilter verbleibende Algenmasse wird vom Filter abgenommen und bei – 20°C eingefroren. Ein Fermenter kann bis zu fünfmal geerntet werden. Wenn sich im zweiten oder dritten Zyklus eine Wachstumsverzögerung zeigt, werden 3.5 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  zugesetzt, um die Phosphatvorräte wieder aufzufüllen.

Die gesammelte, gefrorene Algenmasse wird lyophilisiert und gewogen. Das Algenmaterial wird in etwas n-Hexan aufgenommen und püriert, bevor es in eine Extraktionshülse gefüllt wird. In einer Soxhletapparatur wird es erst mit 1.5 l n-Hexan über Nacht extrahiert, dann auf gleiche Weise mit Aceton und abschließend mit einer Mischung aus 20% Methanol und 80% Chloroform. Nachdem die Hülse noch zwei- bis dreimal mit je 100 ml kaltem Methanol gespült wurde, wird das Algenmaterial über Nacht im Abzug getrocknet. Das trockene Material wird eingewogen und zu je 1 g Algenmasse werden 20 ml 1 M HCl zugegeben. Die Hydrolyse erfolgt innerhalb von 40-48 h unter Rückfluß. Nachdem die Lösung abgekühlt ist, wird sie über einen Glasfaserfilter GF10 abfiltriert und im Rotationsverdampfer bis fast zur Trockene eingengt und lyophilisiert. Der Rückstand wird in wenig Wasser aufgenommen und mit NaOH auf pH 3 titriert, wobei der NaOH-Verbrauch notiert wird, um später den Anteil an NaCl an der Gesamtmasse berechnen zu können. Zu der Lösung werden 0.15 g Aktivkohle pro 1 g extrahiertes Algenmaterial zugegeben. Die Mischung wird 30 min bei RT gerührt und anschliessend filtriert. Das Filtrat wird im Rotationsverdampfer eingengt und lyophilisiert.

Abschliessend wird die Menge des Algenhydrolysats bestimmt und die Menge an NaCl ausgerechnet, um den Nettopeptongehalt zu berechnen. Ausserdem wird eine Probe zur Aminosäureanalyse gegeben, um den relativen Anteil der einzelnen Aminosäuren zu bestimmen. Für die Markierung der halobakteriellen Proteine werden ca. 6 g Nettoalgenpepton für 1 l Halomedium eingesetzt.

Algenmedium, 10 l:

1l 10×MS Salze

50 ml Eisenlösung

Nitrat in fester Form zugeben (19 g auf 1 l)

pH-Wert auf 6.0 einstellen.

10×MS Salze

1. 4.4 g  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  in 900 ml  $\text{H}_2\text{O}$  lösen
2. 3.4 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$
3. 3.7 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (15 mmol)
4. 0.169 g  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (Stammlösung)
5. 0.062 g  $\text{H}_3\text{BO}_3$  (Stammlösung)
6. 0.106 g  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (Stammlösung)
7. 0.0083 g KI (Stammlösung)
8. 0.0025  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
9. 0.250 mg  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
10. 0.250 mg  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
11. ad 1 l  $\text{H}_2\text{O}$

Reihenfolge der Salzzugabe beachten. Einen pH-Wert zwischen 5.8 und 6 einstellen mit NaOH und HCl.

Eisenlösung, 100 ml:

- 745 mg  $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
- 557 mg  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

Beide Salze getrennt in je 50 ml  $\text{H}_2\text{O}$  durch Erwärmen lösen und anschließend zusammengeben.

#### 2.4.2 Kultivierung markierter *H. salinarum* Zellen

Für die Isolierung des  $^{15}\text{N}$ - bzw.  $^{15}\text{N},^{13}\text{C}$ -markierten *H. salinarum* Ferredoxins wurde der Stamm S9 verwendet. Die Zellen werden in Halostandardmedium gezogen, bei dem das Pepton durch markiertes Algenpepton ersetzt wird. Für die  $^{13}\text{C}$ -Markierung wird außerdem kein Citrat zum Medium gegeben.

Nach Zugabe des Peptons den pH-Wert auf pH 7.0 einstellen

#### Halostandardmedium ohne Pepton

NaCl p.a.	250 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	20 g
KCl	2 g
Tris	1.2 g
Citrat	3 g
Lösung III	10 ml
Metalllösung	100 µl
Vitaminlösung	200 µl

#### Lösung III

3 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O und 3 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> auf 200 ml

#### Metalllösung

CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	70 mg
CuSO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	5mg
FeCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	230 mg
MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	30 mg
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	44 mg
Ascorbinsäure	2 g
H <sub>2</sub> O	ad 10 ml

#### Vitaminlösung

Thiamin	100 mg
Folsäure	100 mg
Biotin	10 mg
H <sub>2</sub> O	ad 10 ml

Es wird eine 35 ml Kultur mit markiertem Halostandardmedium inokuliert und aus dieser werden nach fünf Tagen acht 35 ml Vorkulturen angeimpft. Nachdem diese fünf Tage gewachsen sind werden sie zu 8×700 ml Kulturen in 2 l Kolben gegeben. Die Hauptkulturen werden nach 6 Tagen durch Zentrifugation bei 9000 rpm in einem GS3 Rotor 30 min zentrifugiert. Das Pellet wird für die Aufreinigung des Ferredoxins verwendet.

## 2.5 Proteinexpression und Proteinaufreinigung

### 2.5.1 Prinzipien der verschiedenen Säulenchromatographien

Bei der **Gelfiltration** erfolgt die Auftrennung der Proteine nach ihrem hydrodynamischen Durchmesser. Gelfiltrationssäulen bestehen aus verschieden stark vernetzten Trägermaterialien wie z.B. Cellulose, die eine poröse Matrix ausbilden. Die Poren der Matrix sind verschieden groß und damit stehen Proteinen mit verschiedenen Durchmessern unterschiedliche Hohlräume zur Verfügung. Größeren Proteinen besitzen deshalb ein geringeres Elutionsvolumen als kleinere. Um eine gute Trennung der Proteine zu erreichen, sollte das aufgetragene Probenvolumen 5% des Säulenvolumens nicht überschreiten.

Bei der **Ionenaustauscherchromatographie** werden die Proteine in Abhängigkeit von ihrer Nettoladung aufgetrennt. Anionenaustauschermaterialien besitzen positiv geladene Gruppen, mit denen die negativen Ladungen der Proteine wechselwirken. Je größer die negative Ladung eines Proteins ist, desto stärker bindet es an die Säule und umso höher muß die Salzkonzentration der Elutionslösung sein, um die elektrostatischen Wechselwirkungen zu schwächen. Da Ferredoxine eine vergleichsweise hohe negative Nettoladung aufweisen, lassen sie sich gut über Anionenaustauschersäulen aufreinigen. Die Ionenaustauscherchromatographie läßt sich ausserdem gut zum Aufkonzentrieren eines Proteins nutzen.

Bei der **hydrophoben Chromatographie** werden Proteine abhängig von ihrer Hydrophobizität aufgetrennt. Bei hoher Ionenstärke des Auftragspuffers binden die Proteine über hydrophobe Wechselwirkungen an das Säulenmaterial, mit sinkender Ionenstärke des Elutionspuffers nehmen die hydrophoben Kräfte ab und somit können die Proteine von der Säule gewaschen werden. Auch in diesem Fall wird das Protein aufkonzentriert.

### 2.5.2 Überexpression von Fdxana

Zur Expression werden 35 ml Kulturen des BL21DE3(RIL) mit dem Plasmid pET36b-Fdxana über Nacht bei 37 °C in TB mit Kanamycin und Chloramphenicol gezogen. Die 35 ml Kultur wird bei 4000×g für 10 min abzentrifugiert und in ein paar Millilitern frischem Medium resuspendiert. Hiermit wird eine 3 l Kultur im 5 l Schikanekolben angeimpft und nach einer Stunde bei 25 °C und 150 rpm werden 60 ml einer 20% Glucoselösung zugegeben. Bei einer



OD zwischen 0.5-0.7 wird 1 M IPTG zu einer Endkonzentration von 0.5 mM zugegeben. Die Expression erfolgt für 3 h bei 25 °C, anschliessend wird bei 4000g für 10 min abzentrifugiert.

### 2.5.3 Überexpression der GST-Fusionsproteine

Für die Expression der GST-Fusionsproteine werden 35 ml Kulturen des BL21(DE3)RIL mit den entsprechenden Vektoren (pGEX4.1-FdxWt, pGEX4.1-Fdxana, pGEX4.1-Fdxequi) über Nacht bei 37 °C in LB mit Ampicillin gezogen. Die 35 ml Kulturen werden bei 4000 g für 10 min abzentrifugiert und in frischem Medium resuspendiert. Hiermit wird eine 1 l Kultur angeimpft, die bei 25 °C und 150 rpm geschüttelt wird. Bei einer OD von 0.5-0.7 mit 1 mM IPTG induziert. Nach 4 h bei 25 °C werden die Zellen durch Zentrifugation bei 4000 g, 10 min geerntet.

### 2.5.4 Aufreinigung des Fdxana

Das Zellpellet wird in 25 mM Tris pH 8.5 aufgenommen, dem eine Spatelspitze DNase und pro 50 ml eine Proteaseinhibitortablette (ohne EDTA) zugegeben wird. Die Zellen werden in drei Durchgängen in der French Press aufgeschlossen und anschliessend 10 min bei 20000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird auf 8 M Harnstoff und 100 mM DTT gebracht und anschliessend eine Stunde im Stickstoffstrom gerührt. Einer 30 ml Lösung werden je 200 µl 100 mM FeSO<sub>4</sub>- und 100 µM Na<sub>2</sub>S-Lösung zugegeben. Es wird weitere 10 min unter N<sub>2</sub> gerührt und dann wird die Lösung mit N<sub>2</sub>- gespültem 25 mM Tris-Puffer pH 8.5 auf 1/8 verdünnt. Anschliessend werden noch einmal 240 ml sauerstoffgesättigter Trispuffer zugegeben.

Im Batchverfahren wird die Lösung mit 10 ml DEAE Sephacel (mit 0.1 M NaCl, 25 mM Tris pH 8.5 equilibriert) für eine Stunde bei 4°C gerührt. Nach kurzem Stehen lassen (ungefähr eine Viertelstunde) wird ein Grossteil des Überstandes abgenommen und dann die DEAE in eine Säule gepackt. Sie wird mit 0.1 M NaCl, 25 mM Tris pH 8.5 so lange gewaschen, bis der Durchlauf farblos ist (bzw. die Absorption bei 280 nm auf null zurückgegangen ist) und dann wird das Fdxana mit 1 M NaCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> /NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7.5 eluiert.

Zur weiteren Aufreinigung wird des Eluat so verdünnt, dass die NaCl-Konzentration 0.2 M ist. Es wird auf eine Säule mit dem Anionenaustauschermaterial Q-Sepharose fast flow (equilibriert mit 0.2 M NaCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> /NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7.5) aufgetragen und nach einem Waschschrift mit dem Auftragspuffer wird ein Gradient über 400 ml bis zu einer

Endkonzentration von 0.6 M NaCl angelegt. Das Fdxana (identifizierbar über die Absorptionen bei 417 nm und 450 nm) eluiert bei einer Salzkonzentration von etwa 0.33 M. Ein weitere Aufreinigung kann durch hydrophobe Chromatographie mit Hydroxyapatit erfolgen. Hierzu wird ein Stufengradient von 10 mM, 25 mM und abschliessend 50 mM Natriumphosphatpuffer angelegt. Der letzte Reinigungsschritt besteht aus einer Gelfiltration über eine Superose 12-Säule.

#### **2.5.5 Aufreinigung der GST-Fusionsproteine**

Das Zellpellet wird in PBS Puffer aufgenommen und die Zellen per Ultraschall aufgeschlossen. Das Zelllysate wird für 30 min bei 20000 rpm im SS34 Rotor zentrifugiert und dem Überstand wird 0.1% w/v Triton X-100 zugesetzt. Zu 10 ml Lösung werden 0.5 ml Glutathion-Sepharose4B zugegeben, die mit PBS equilibriert wurde.

Das Säulenmaterial wird bei 500 g für 5 min abzentrifugiert und mit dreimal 10 ml PBS Puffer durch wiederholtes Resuspendieren und Abzentrifugieren gewaschen. Die Abspaltung des Ferredoxins von der Glutathion-S-Transferase mit Thrombin erfolgt auf der Säule über Nacht bei RT. Mit PBS wird das gewünschte Protein von der Säule gewaschen.

#### **2.5.6 Aufreinigung von Ferredoxin aus Halobakterien**

Die Zellen werden nach 5-7 Tagen durch Zentrifugation bei 5500 rpm im GS3 Rotor für 30 min geerntet. Der Aufschluß der Zellen erfolgte je nach Verwendungszweck entweder durch Ultraschall oder Dialyse gegen Wasser. Letztere Methode wird ebenfalls zur Isolierung von Bakteriorhodopsin aus *H. salinarum* genutzt (Oesterhelt, 1995). Durch anschließende Zentrifugation kann die hauptsächlich aus Bakteriorhodopsin bestehende Purpurmembran von den löslichen Zellbestandteilen getrennt werden. Somit konnte bei der kostspieligen Isotopenmarkierung der Zellen mit  $^{15}\text{N}$  und  $^{13}\text{C}$  parallel zur Ferredoxinaufreinigung markiertes Bakteriorhodopsin gewonnen werden. Danach wurde das Zelllysate (3 h, 4°C) gegen 40% Ammoniumsulfat dialysiert, oder entsprechend durch Zugabe von festem Ammoniumsulfat (mindestens 1 h rühren) und Einstellung des pH-Wertes mit Phosphatpuffer auf eine Konzentration von 40% gebracht. Durch einstündige Ultrazentrifugation bei 4°C, 30000 rpm mit dem Ti45 Rotor für eine Stunde werden ausgefallene Proteine abgetrennt. Zum Überstand wird festes Ammoniumsulfat gegeben, so dass eine Konzentration von 60%

erreicht wird (der pH wird mit 1N NaOH wieder auf 6.6 gebracht). Nach einer Stunde Rühren wird wieder bei 30000 rpm für eine Stunde zentrifugiert.

Die weiteren Reinigungsschritte finden bei Raumtemperatur statt. Der Überstand wird auf eine Sepharose4B-Säule gegeben (für die Aufreinigung aus 8 l eine Säule mit Ø 1.5 cm, 12 cm lang), die vorher mit 60% Ammoniumsulfatpuffer equilibriert wurde. Es wird mit 60% Ammoniumsulfatpuffer gewaschen (350 ml) und ein Gradient bis zu 30% Ammoniumsulfat über 2 l gefahren. Die Fraktionen des Peaks mit Absorptionen bei 420 nm und 460 nm werden zusammengegeben und durch Zugabe von festem Ammoniumsulfat wieder auf 60% gebracht. Die gesammelten Fraktionen der ersten Säule werden auf eine DEAE-Säule (Ø 1.5 cm, 7 cm lang) gegeben und mit 24% Ammoniumsulfatpuffer eluiert. Falls das Absorptionsverhältnis  $A_{420\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$  unter 0.3 liegt, wird die Anionentauscherchromatographie wiederholt.

Ansonsten wird die Ammoniumsulfatkonzentration des Eluats wieder auf 60% Ammoniumsulfat eingestellt und auf eine kleine Menge DEAE gegeben, mit Hochsalzpuffer eluiert und auf diesem Weg aufkonzentriert.

#### Basalsalz

4.3 M NaCl	250 g
80 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	20g
27 mM KCl	2g
10 mM $\text{Na}_3\text{Citrat}$	3g
$\text{H}_2\text{O}$	ad 1 l

mit NaOH auf pH 7.0-7.2 einstellen, autoklavieren

Elutionspuffer für die DEAE-Sepharose- und die Sepharose-4B-Chromatographie des Ferredoxins aus *H. salinarum*:

#### Ammoniumsulfatpuffer

60%	456 g/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
30%	228 g/l
24%	182 g/l
10 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ pH 6.6	

#### Hochsalzpuffer

4.3 M NaCl, 10mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$  pH 7.3

### 2.5.7 Aufreinigung des Ferredoxins aus *H. volcanii*

*H. volcanii* Zellen wurden nach 6 Tagen Wachstum bei 37°C geerntet. Das Zellpellet wurde in Basalsalz aufgenommen, und die Zellen mit Ultraschall aufgeschlossen. Anschließend wurde gegen 40% Ammoniumsulfat dialysiert und nach Ultrazentrifugation der Überstand mit festem Ammoniumsulfat auf 60% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> gebracht. Ausgefallene Proteine wurden durch Zentrifugation abgetrennt (analog zu 2.5.6). Beim Auftrag des Überstandes auf eine mit 60% Ammoniumsulfat equilibrierte Sepharose4B-Säule wurde das Ferredoxin, sichtbar als braunrote Bande, auf dem Säulenmaterial aufkonzentriert. Elution mit einem Gradienten von 60% auf 30% Ammoniumsulfat und anschließende Chromatographie über eine DEAE-Säule lieferte ein braunrotes Eluat, welches Absorptionsmaxima bei 280 nm, 330 nm, 420 nm und 470 nm besitzt.

### 2.5.8 Reinigung von His-Tag Ferredoxin mit Hilfe einer Ni-NTA-Säule

Bei der Metallaffinitätschromatographie mit Ni-NTA (Nickel-Nitrilotriessigsäure)-Sepharose wird die spezifische Bindung von Imidazolgruppen an Ni<sup>2+</sup>-Ionen genutzt. Die Ni<sup>2+</sup>-Ionen werden von Nitrilotriessigsäure, einem vierzähligen Liganden, komplexiert und damit auf der Sepharose immobilisiert. Somit sind vier der sechs Bindungsstellen des Ni<sup>2+</sup> besetzt, die freien Koordinationsstellen können von den Stickstoffatomen des Imidazols belegt werden. Darüber können Histidinreiche Proteine an die Ni-NTA-Säule binden und damit abgetrennt werden.

Ferredoxin, das einen His-Tag aus sechs aufeinander folgenden Histidinen besitzt, kann auf diesem Weg aufgereinigt werden. Die Zellen werden in Lysepuffer resuspendiert und per Ultraschall aufgeschlossen. Nach 20 min Zentrifugation bei 20000 rpm im SS34 Rotor wird der Überstand auf eine Ni-NTA Säule gegeben, die mit Lysepuffer equilibriert wurde. Verunreinigungen werden mit Waschpuffer entfernt und das His-Tag Ferredoxin mit Elutionspuffer von der Säule eluiert.

Lysepuffer

NaCl	1 M
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 8.0	50 mM

#### Waschpuffer

NaCl	1 M
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 8.0	50 mM
Imidazol	20 mM

#### Elutionspuffer

NaCl	1 M
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 8.0	50 mM
Imidazol	250 mM

### 2.5.9 Rekonstitution des HsFdx

Die Rückfaltung von Ferredoxinen erfordert die Zugabe von Eisen- und Sulfidionen zur Lösung, da eine gleichzeitige Rekonstitution des Eisen-Schwefel-Komplexes notwendig ist. Für die Rückfaltungsversuche werden zu 1 ml einer 50 mM HsFdx-Lösung 700 µl 10 % TCA (Trichloressigsäure) auf Eis in 50 µl Portionen über einen Zeitraum von einer halben Stunde zugegeben. Anschließend wird die Lösung 15 min bei 4 °C geschüttelt. Nach der Zentrifugation für 10 min bei 14000 rpm wird der Überstand abgegossen und das Pellet in 400 µl Lösung A aufgenommen. Das Protein wird unter Stickstoff 40 min in der Lösung A inkubiert und dann werden je 20 ml von 100 mM Lösungen Na<sub>2</sub>S und FeSO<sub>4</sub> zugegeben. Der Ansatz wird 30 min bei Raumtemperatur stehen gelassen und dann mit Lösung B auf insgesamt 6 ml verdünnt.

Es wird 2 h gegen Lösung C dialysiert und abschließend üN gegen Lösung D dialysiert.

#### Lösung A

100 mM Tris pH 9.0
100 mM DDT
8 M Harnstoff

#### Lösung B

100 mM Tris pH 8.5
x M NaCl

Lösung C

10 mM Tris pH 8.0

x M NaCl

Lösung D

10 mM Phosphatpuffer pH 7.3

x M NaCl

### 2.5.10 Aufnahme von UV/VIS Spektren

Für die Absorptionsmessungen wurde das DW-2a UV-VIS Spektralphotometer von Aminco benutzt. Folgende Einstellungen wurden standardmässig eingesetzt:

Split, sample&ref	dual
Slit	2 nm
Response	medium
Baselinecorrection	out
Wellenlängenbereich	250-550 nm
Choppergeschwindigkeit	normal
Geschwindigkeit	2-5 nm/s

Der Absorptionsbereich wurde je nach Konzentration der Probe zwischen 0.2-2 gewählt.

Für temperaturabhängige Messungen ist eine Temperierung des Küvettenhalters über einen Thermostaten möglich. Sowohl Probe als auch Referenz wurden bei temperaturabhängigen Messungen gerührt, um einen raschen Temperatúrausgleich innerhalb der Küvette zu gewährleisten.

Eine „langsame“ Temperaturerhöhung (ca. 2 °C pro Minute) kommt dadurch zustande, dass bei RT (20°C) begonnen wird und der Thermostat auf 90°C gestellt wird.

Für ein „schnelles“ Aufheizen wird die Probenküvette in die auf 80 °C vorgeheizte Küvettenhalterung gestellt. Innerhalb von ca. 10 min wird eine Temperatur von 70 °C erreicht (ca. 5 °C/min).

Für kinetische Messungen kann die Zeitskala im Bereich von 20 bis 100 s/inch variiert werden.

### 2.5.11 Circulardichroismus (CD)-Spektroskopie

Die CD-Spektroskopie nutzt die unterschiedliche Absorption einer optisch aktiven Substanz von links- bzw. rechtsgerichtetem zirkular polarisiertem Licht. Gemessen wird die Elliptizität  $\theta$  in Abhängigkeit von  $\lambda$ , welche wie folgt definiert ist:

$$\theta(\lambda) = (\varepsilon_L - \varepsilon_R) \cdot c \cdot d,$$

wobei  $\varepsilon$  für den Absorptionskoeffizienten von links- bzw. rechtspolarisiertem Licht steht,  $c$  für die Konzentration der optisch aktiven Substanz und  $d$  für die Schichtdicke der Küvette. Die CD-Banden werden auch als Cotton-Effekt bezeichnet. Ein Protein zeigt aufgrund der Chiralität seiner Sekundärstrukturelemente charakteristische Cotton-Effekte zwischen 160 und 250 nm.

Die spezifischen Cotton-Effekte eines Proteins, dessen Sekundärstruktur vorwiegend aus  $\alpha$ -Helices besteht, setzen sich aus einer negativen Bande bei 222 nm ( $n \rightarrow \pi^*$  Übergänge) und bei 207 nm sowie einer positiven Bande bei 192 nm zusammen. Die kurzwelligen Banden kommen durch  $\pi \rightarrow \pi^*$  Übergänge der Carbonylfunktionen zustande.

Die antiparallele  $\beta$ -Faltblattkonformation eines Proteins ist die Ursache für ein Minimum zwischen 215 bis 220 nm und ein Maximum bei 195 nm.

### 2.5.12 Differential Scanning Calorimetry (DSC)

Die Wärmekapazität eines Proteins ist bei seiner Denaturierung maximal. Die absolute Änderung der Wärmekapazität eines Proteins in Abhängigkeit von der Temperatur ist im Vergleich zur Wärmekapazität der Lösung sehr gering. Daher wird die Änderung als Wärmekapazitätsdifferenz zwischen der Proteinlösung und einer Referenzlösung gemessen.

Für die Berechnung der Temperatur  $T_m$ , bei der die Entfaltung des Proteins stattfindet, wird die Wärmekapazitätsdifferenz gegen die Temperatur aufgetragen und durch eine Kurve angepaßt, welche den theoretischen Verlauf der Wärmekapazitätsdifferenz bei der Denaturierung darstellt.

## 2.6 Strukturbestimmung anhand der NMR Daten

### 2.6.1 Theoretische Grundlagen

Seit Beginn der 80er Jahre hat Kurt Wüthrich die Anwendung der NMR (Nuclear Magnetic Resonance) Spektroskopie auf Proteine etabliert. In Zusammenarbeit mit Richard Ernst hat er davon ausgehend dreidimensionale Methoden entwickelt.

Einige Atomkerne, wie  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  und  $^{15}\text{N}$ , besitzen ein magnetisches Moment  $\mu$ , welches durch den quantenmechanischen Drehimpuls  $J$  des Kerns, auch **Spindrehimpuls** genannt, verursacht wird. Für die theoretische Beschreibung der Kernspinzresonanz werden zwei Methoden eingesetzt: Zum einen der klassische Vektorformalismus, und zum anderen der quantenmechanische Produktoperatorformalismus. Der **Vektorformalismus** hat den Vorteil, dass er durch seine Analogie zu Modellen aus der Mechanik anschaulicher ist, während der **Produktoperatorformalismus** zum Verständnis von drei- und vierdimensionalen NMR-Spektren erforderlich ist. Im folgenden Abschnitt soll eine kurze theoretische Einführung in die NMR Spektroskopie gegeben werden, zu diesem Zweck wird der Vektorformalismus herangezogen.

Der Spindrehimpuls  $J$  eines Atomskerns ist gequantelt gemäß:

$$|\vec{J}| = \sqrt{I(I+1)}\hbar \quad \text{Gleichung 1}$$

mit  $\hbar = \frac{h}{2\pi}$  (Plancksches Wirkungsquantum)

Die Kernspinquantenzahl  $I$  eines Atoms kann folgende Werte haben:

$$I = 0, \frac{1}{2}, 1, 1\frac{1}{2}, \dots$$

In einem magnetischen Feld übt der Spindrehimpuls ein magnetisches Moment  $\mu$  auf den Kern aus:

$$\vec{\mu} = \gamma \cdot \vec{J} \quad \text{und} \quad |\vec{\mu}| = \gamma \cdot \hbar \sqrt{I(I+1)} \quad \text{Gleichung 2}$$

Die Proportionalitätskonstante  $\gamma$  ist charakteristisch für eine Kernsorte und wird als **gyromagnetisches Verhältnis** bezeichnet. Je größer  $\gamma$  ist, desto höher ist die Empfindlichkeit des Isotops in der NMR-Spektroskopie.



Tabelle 1: Eigenschaften verschiedener Isotope.

Kernisotop	Spin I	natürliche Häufigkeit in %	Gyromagnetisches Verhältnis $\gamma$ ( $10^7 \text{ rad T}^{-1} \text{ s}^{-1}$ )
$^1\text{H}$	$\frac{1}{2}$ ,	99.98	26.75
$^{12}\text{C}$	0	98.9	-
$^{13}\text{C}$	$\frac{1}{2}$ ,	1.1	6.72
$^{14}\text{N}$	1	99.63	1.93
$^{15}\text{N}$	$\frac{1}{2}$ ,	0.37	-2.72

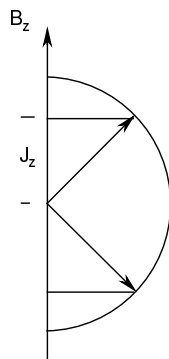
In einem magnetischen Feld orientiert sich der Spindrehimpuls  $J$  so, dass seine Komponente in Feldrichtung ( $J_z$ ) ein halb- oder ganzzahliges Vielfaches des Plankschen Wirkungsquantum ist.

$$J_z = m \cdot \hbar \Rightarrow \mu_z = m \cdot \gamma \cdot \hbar$$

Gleichung 3

Die magnetische Quantenzahl  $m$  kann ganzzahlige Werte von  $-I$  bis  $+I$  annehmen, es gibt also  $2I+1$  Möglichkeiten der Orientierung.

Abbildung 4: Möglichkeiten der Orientierung des Spindrehimpulses zum Magnetfeld.



Bei einem Spin von  $\frac{1}{2}$  gibt es zwei mögliche Orientierungen: parallel zum äußeren Magnetfeld ( $m = \frac{1}{2}$ ) und antiparallel ( $m = -\frac{1}{2}$ ).

Die Energie der beiden Niveaus ergibt sich aus der klassischen Formel für einen magnetischen Dipol in einem homogenen Magnetfeld der Stärke  $B_0$ :

$$E = -\mu_z B_0 = -m \cdot \gamma \cdot \hbar \cdot B_0$$

Gleichung 4

Die Energiedifferenz der beiden Zustände ist bei  $\Delta m = 1$ :

$$\Delta E = \gamma \cdot \hbar \cdot B_0$$

Gleichung 5

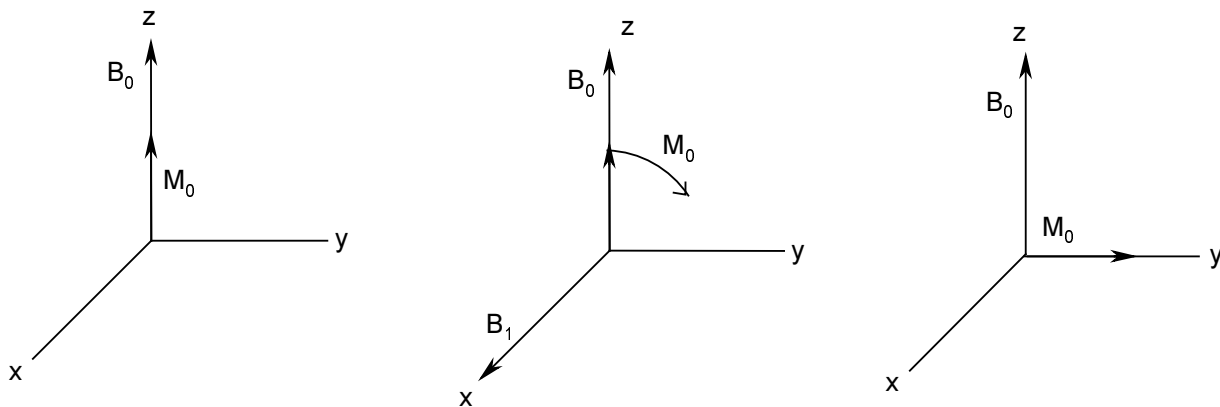
und aus  $E = h \nu$  folgt:

$$\nu = \frac{\gamma \cdot B_0}{2\pi} \quad \text{Gleichung 6}$$

Die beiden letzten Formeln zeigen deutlich die Abhängigkeit der Energie und damit der Resonanzfrequenz von der Stärke des angelegten Magnetfeldes.

Früher wurde bei konstantem Magnetfeld  $B_0$  die Frequenz der eingestrahlten Radiowellen variiert und ihre Absorption durch die Probe gemessen, um die Resonanzbedingungen zu bestimmen. Heute wird mit der **Fourier-Transformations (FT)-NMR Spektroskopie** gearbeitet. Dabei wird ein kurzer Radiopuls der Frequenz  $\nu_0$  zur Anregung genutzt. Energie und Zeit sind komplementär, und nach der Heisenbergschen Unschärferelation erhält man bei kurzer Anregungsdauer ein Frequenzband um  $\nu_0$  herum. So erreicht man eine gleichzeitige Anregung mehrerer Kernspins, womit eine schnellere Spektrenaufnahme möglich wird.

**Abbildung 5: Auslenkung der resultierenden Magnetisierung durch Anlegen eines Magnetfeldes.**



### 2.6.2 Vektormodell

Die Belegung der Energiezustände parallel (p) und antiparallel (a) zum Magnetfeld folgt im thermischen Gleichgewicht der Boltzmannverteilung ( $k_b$  : Boltzmannkonstante):

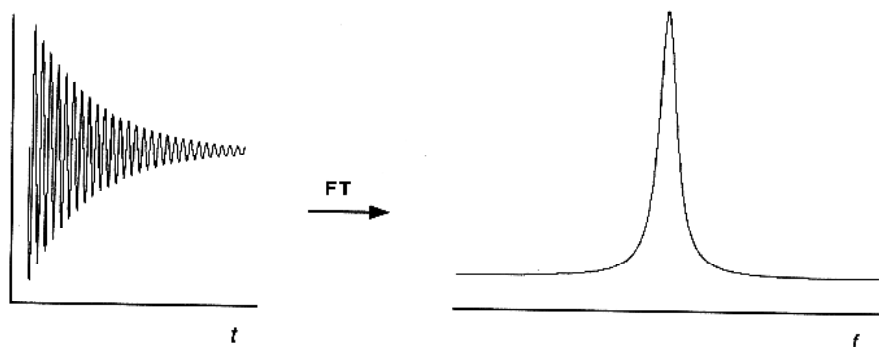
$$N_a/N_p = e^{-\Delta E/k_b T} \quad \text{Gleichung 7}$$

Da keine Gleichverteilung zwischen den beiden Zuständen besteht, gibt es eine resultierende Magnetisierung entlang der z-Achse. Wird eine elektromagnetische Welle in Form eines Radiopulses eingestrahlt, wird ein zweites Magnetfeld  $B_1$  induziert, das auch eine Komponente in der xy Ebene enthält. Die Magnetisierung  $M_0$  beginnt, um  $B_1$  zu präzessieren.

Durch einen  $90^\circ$  Puls wird erreicht, dass die resultierende Magnetisierung komplett in die xy Ebene ausgelenkt wird.

Nachdem der Radiopuls beendet ist, induziert die Präzession von  $M_0$  um  $B_0$  Radiosignale, den sogenannten „Free Induction Decay“ (FID), welcher exponentiell mit der Zeit abklingt. Mit Hilfe der Fourier-Transformation (FT) erhält man aus dem FID das Frequenzspektrum:

**Abbildung 6: Graphische Darstellung der Fouriertransformation.**



Man unterscheidet zwei Relaxationszeiten: zum einen die Relaxationszeit  $T_2$ , in der die transversale Magnetisierung  $M_{x,y}$  gegen Null geht, und zum anderen  $T_1$ , in der die longitudinale Magnetisierung auf ihren ursprünglichen Wert zurückgeht.

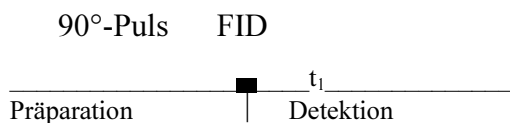
Für Protonen liegt  $T_1$  im Bereich von einer bis zu mehreren Sekunden,  $T_2$  variiert zwischen 10 und 500 ms. Die Radiopulse dauern nur einige  $\mu\text{s}$ , deshalb wird die Relaxation während des Pulses vernachlässigt.

Die longitudinale und die transversale Relaxation sind auf unterschiedliche Wechselwirkungen zurückzuführen.  $T_1$  wird als Spin-Gitter-Relaxation bezeichnet, da sie auf Wechselwirkungen des Spins mit der Umgebung zurückzuführen ist. Die transversale Relaxation  $T_2$  beruht auf Wechselwirkungen der Spins untereinander und wird deshalb Spin-Spin-Relaxation genannt.

### 2.6.3 Aufnahme von NMR-Spektren: 1D-NMR-Experiment

Ein 1D-NMR-Experiment besteht aus zwei Phasen: Der Präparation und der Detektion. Während der Präparation wird das Spinsystem in einen definierten Zustand gebracht. Der FID wird während der Dektektionsphase aufgezeichnet:

**Abbildung 7: 1D-NMR-Experiment.**



Nachdem das System wieder zum Ausgangszustand zurückgekehrt ist, kann das Experiment wiederholt werden. Durch eine Überlagerung der verschiedenen Ergebnisse wird das Signal-Rausch-Verhältnis verbessert. Die Fourier-Transformation liefert die Resonanzfrequenzen der Kernspinübergänge.

Die Resonanzfrequenz eines Protons hängt von seiner chemischen Umgebung ab. In einem Molekül erzeugen die umgebenden Elektronen ein schwaches Magnetfeld, welches sich zu dem Hauptfeld  $B_0$  addiert. Dieser Effekt wird als chemische Verschiebung bezeichnet.

Der Wert der chemischen Verschiebung  $\sigma$  wird in ppm (parts per million) in Bezug auf einen Standard definiert:

$$\sigma = [(\omega_{\text{Signal}} - \omega_{\text{Referenz}}) / \omega_{\text{Referenz}}] \cdot 10^6 \text{ ppm} \quad \text{Gleichung 8}$$

Die chemische Verschiebung ist im Gegensatz zu der Frequenz unabhängig von der Stärke des Magnetfeldes  $B_0$ . Bei Proteinen kann man  $H^N$ ,  $H^\alpha$ , aromatische und aliphatische Protonen anhand ihrer charakteristischen chemischen Verschiebung unterscheiden.

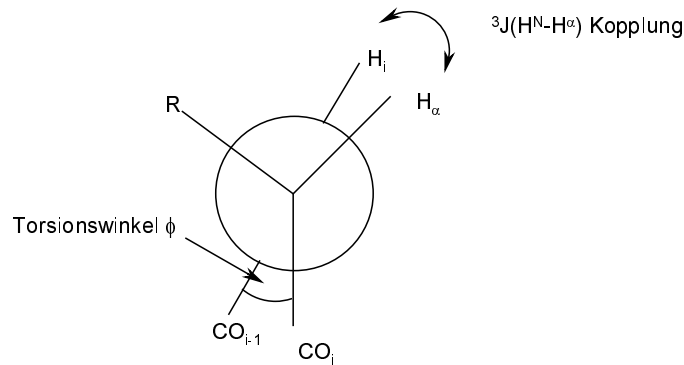
Durch **skalare Kopplung** über die Elektronen der Atombindung wird die Magnetisierung zwischen benachbarten Kernen übertragen. Dies führt zu einer Aufspaltung ihrer Signale im NMR-Spektrum, da die parallele oder antiparallele Stellung eines Kernspins die Energie der parallelen und antiparallelen Ausrichtung des gekoppelten Kernspins beeinflusst. Die Aufspaltungsbreite der Signale ist abhängig von der Stärke der Kopplung und wird als Kopplungskonstante  $J$  bezeichnet. Die Stärke des Magnetfeldes  $B_0$  hat keinen Einfluß auf die Größe der Kopplungskonstanten. In der Regel können skalare Kopplungen über eine Bindung ( $^1J$ ), zwei Bindungen ( $^2J$ , geminale Kopplung) und drei Bindungen ( $^3J$ , vicinale Kopplung) beobachtet werden.

Die vicinale Kopplung  $^3J$  hängt von dem Torsionswinkel der beiden Protonen ab, wobei die Stärke der Kopplung durch die **Karplus-Beziehung** beschrieben wird:

$$J(\phi) = A \cos^2(\phi - 60) - B \cos(\phi - 60) + C \quad \text{Gleichung 9}$$

Bei A, B und C handelt es sich um empirisch bestimmte Konstanten. Für die Strukturbestimmung von Proteinen sind die  $^3J(\text{H}^{\text{N}}-\text{H}^{\alpha})$ -Kopplungskonstanten wichtig, da sie Aufschluß über den Torsionswinkel  $\phi$  des Proteinerückgrats geben.

Abbildung 8: Torsionswinkel  $\phi$ .



Die **dipolare Kopplung** kommt durch Wechselwirkung räumlich benachbarter Kernspins zustande. Die Stärke der Kopplung ist umgekehrt proportional zu ihrem Abstand:

$$J(\text{Dipol}) \propto 1/r^6$$

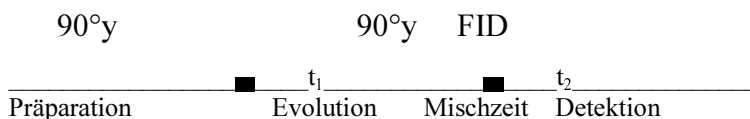
Gleichung 10

Damit ein Magnetisierungstransfer über dipolare Kopplung stattfinden kann, dürfen die Kerne nicht weiter als 5 Å voneinander entfernt sein.

## 2.6.4 Zwei- und mehrdimensionale NMR Spektroskopie

Bei der mehrdimensionalen NMR Spektroskopie kommen zur Präparations- und Detektionszeit noch zwei weitere Elemente hinzu. Der Präparationszeit wird eine Evolutionszeit angeschlossen, während derer die Spins frei präzedieren können. Mit der darauffolgende Mischsequenz wird die Magnetisierung vom ersten Kern auf andere durch skalare oder dipolare Kopplung übertragen.

Abbildung 9: 2D-NMR-Experiment.



Die Fourier-Transformation nach  $t_2$  liefert ein gewöhnliches eindimensionales Spektrum, das eine Momentaufnahme nach gegebener Zeit  $t_1$  darstellt. Für ein zweidimensionales Spektrum wird die Zeit  $t_1$  inkrementweise erhöht, und so die zeitliche Entwicklung der Spinsysteme

während unterschiedlich langer Evolutionszeiten verfolgt. Durch eine weitere Fouriertransformation nach  $t_2$  erhält man das 2D-Spektrum.

In einem homonuklearen 2-D-Spektrum liegen die entsprechenden im 1-D-Spektrum zu beobachtenden Signale auf der Diagonalen. Abseits von der Diagonalen liegen Signale von zwei Kernen, die während der Mischzeit Magnetisierungsanteile ausgetauscht haben. Diese sogenannten Kreuzsignale entstehen also durch Kopplung zweier Kernspins miteinander.

In einem **COSY** (Correlation Spectroscopy)-Experiment erfolgt der Magnetisierungstransfer durch skalare Kopplung. Deshalb sind nur Kreuzsignale für Protonen zu erwarten, zwischen denen nicht mehr als drei Bindungen liegen. Wichtige Informationen liefert ein COSY Spektrum über die Kopplungskonstante zwischen  $H^N$  und  $H^\alpha$  einer Aminosäure und damit über den Torsionswinkel  $\phi$  des Proteinrückgrates.

In einem **TOCSY** (Total Correlation Spectroscopy)-Experiment werden mehrere aufeinanderfolgende Magnetisierungstransfers über skalare Kopplungen bewirkt. Durch die Peptidbindung sind Protonen von zwei verschiedenen Aminosäuren durch mindestens vier Bindungen getrennt. In einem TOCSY Spektrum sind also nur Kreuzsignale für Protonen einer Aminosäure zu sehen, sie werden als Spinsystem bezeichnet.

Anhand des typischen Musters kann z. B. Glycin einwandfrei anhand der COSY und TOCSY Spektren identifiziert werden. Es ist die einzige Aminosäure, die zwei  $\alpha$  Protonen besitzt. Serin und Cystein hingegen weisen identische Spinsysteme auf, da sie jeweils eine  $CH_2$ -Gruppe in  $\beta$ -Stellung tragen.

In einem **NOESY** (Nuclear Overhauser and Exchange Spektroskopie)-Experiment erfolgt der Magnetisierungstransfer über dipolare Kopplungen, d.h. zwischen räumlich eng benachbarten Kernen. Neben den Kreuzsignalen zwischen Kernen, die aufgrund der Primärsequenz nahe zusammen liegen, kann eine Kopplung zwischen Kernen beobachtet werden, die aufgrund der Sekundär- und der Tertiärstruktur des Proteins weniger als 5 Å voneinander entfernt sind.

Die Überlagerung der NOESY mit den COSY und TOCSY Spektren zeigt, welche Kreuzsignale nur im NOESY Spektrum zu finden sind, also durch Kopplung von Protonen verschiedener Aminosäuren zustande kommen. Die Stärke der NOESY-Signale ist stark abhängig von der Entfernung der Kerne untereinander. Da eine quantitative Auswertung nicht möglich ist, werden die Signale in drei Klassen eingeteilt. Für starke Kreuzsignale wird die Distanzbeschränkung bei der Strukturberechnung auf 2.7 Å gesetzt, der Abstand von Kernen, die ein mittleres Signal geben, wird auf 3.5 Å gesetzt, und für schwache Wechselwirkungen

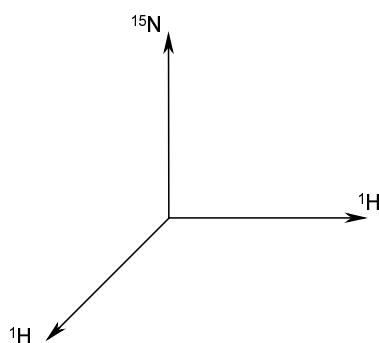
wird eine Entfernung von 5 Å zugelassen. Die dipolare Kopplung zwischen den Kernspins liefert also die Grundlage für die Strukturberechnung eines Proteins.

Je größer ein Protein ist, desto stärker ist die Überlagerung der Signale in den verschiedenen Spektren. Außerdem wird die transversale Relaxationszeit  $T_2$  kleiner, wenn die Bewegung des Moleküls langsamer wird. Dies führt dazu, dass ein Großteil der Magnetisierung schon im Verlauf der Pulssequenz abklingt und nicht mehr detektierbar ist. Somit fehlt eine Reihe von Signalen im COSY und TOCSY, was die Identifizierung von Spinsystemen unmöglich macht. Eine bessere Auflösung der Spektren kann mit Hilfe der heteronuklearen NMR-Spektroskopie erreicht werden. Das **HSQC** (Heteronuclear Single Quantum Coherence)-Experiment verwendet den Magnetisierungstransfer von einem Proton auf einen Heterokern und wieder zurück. Das  $^{15}\text{N}$ -HSQC stellt dabei eines der wichtigsten NMR-Experimente dar. In diesem 2D-Spektrum erhält man Signale für Protonen, die an ein Stickstoff gekoppelt sind, also die Amidprotonen  $\text{H}^{\text{N}}$  und die Protonen der Seitenkettenaminofunktionen.

Die dritte und vierte Dimension in der NMR-Spektroskopie wird durch die Einführung weiterer Evolutions- und Mischzeiten vor der Detektionsphase erreicht. Zu unterscheiden sind 3D-Experimente, die durch Verknüpfung von zwei 2D-Experimenten entstehen und Tripelresonanzexperimente, bei denen drei verschiedene Kerne angeregt werden.

Die Verknüpfung zweier 2D-Experimente findet z.B. im TOCSY-HSQC statt. Im Prinzip wird das 2-dimensionale Spektrum der Protonenresonanzen durch die Kopplung mit Heterokernen wie  $^{15}\text{N}$  und  $^{13}\text{C}$  in die dritte Dimension entzerrt.

**Abbildung 10: Drei Dimensionen eines TOCSY-HSQC Spektrums.**



Der Vorteil der Tripelresonanzexperimente liegt in der geringen Signalüberlagerung und dem effizienten Magnetisierungstransfer, da die Kopplung nur über starke  $^1\text{J}$  und  $^2\text{J}$  Kopplungen erfolgt. Bei der Benennung der Experimente werden die Kerne der Reihe nach aufgelistet, auf welche die Magnetisierung übertragen wird. Die Kerne, deren Resonanzen nicht detektiert

werden, werden in Klammern gesetzt: Beim HNCA-Experiment findet die Übertragung der Magnetisierung vom Amidproton  $H_i$  über den Amidstickstoff  $N_i$  auf ein  $\alpha$ -Kohlenstoffatom statt, die Resonanzen der drei Kerne werden detektiert. Dabei kann sowohl  $C_i$  als auch  $C_{i-1}$  angeregt werden. Im HNCO Experiment ist die Korrelation eines Amidprotons mit dem Carbonylkohlenstoff der vorhergehenden Aminosäure zu sehen. Der Magnetisierungstransfer auf den intraresiduellen Carbonylkohlenstoff würde über HN(CA)CO erfolgen.

### 2.6.5 Signalzuordnung

Bevor die Protonenabstände und Bindungswinkel für die Strukturberechnung einem Spektrum entnommen werden können, muss zuerst eine möglichst vollständige Zuordnung der Signale zu den einzelnen Protonen des Proteins erfolgen. Kurt Wüthrich hat zu diesem Zweck eine Methode entwickelt, die als **sequenzspezifische Zuordnung** (*sequence specific assignment*) bezeichnet wird. In der Primärsequenz benachbarte Aminosäuren werden anhand ihrer Kreuzsignale im NOESY Spektrum erkannt. Interresiduelle und intraresiduelle Kopplungen können durch den Vergleich des NOESY Spektrums mit den COSY und TOCSY Spektren identifiziert werden. Aus den COSY und TOCSY Spektren erhält man die Information, um welchen Aminosäuretyp es sich handelt, und das NOESY Spektrum liefert ihre Reihenfolge. Starke Signalüberlagerungen und das Fehlen von Seitenkettensignalen im TOCSY kann eine Zuordnung allein anhand der 2-dimensionalen Spektren unmöglich machen.

Aus einem HNCA Spektrum ist die Kopplung eines Amidprotons mit dem  $C^\alpha$  der vorangehenden Aminosäure erkennbar. Überlagert man ein HNCA Spektrum mit einem HN(CO)CA Spektrum, bei dem der Magnetisierungstransfer über den Carbonylkohlenstoff nur zum  $C^\alpha$  der vorhergehenden Aminosäure stattfindet, kann man intra- und interresiduelle Kopplungen im HNCA unterscheiden. Bei einer Entartung von  $C^\alpha$  Resonanzen verschiedener Aminosäuren kann zum Beispiel ein HNCO bei der Zuordnung der Signale helfen. Die sequentielle Zuordnung liefert die Konnektivitäten der Spinsysteme. Die Art der Aminosäure wird mit Hilfe von HCCH-TOCSY und HCCH-COSY Experimenten erhalten. Die Zeitdauer des Magnetisierungstrfers ist proportional zu  $1/(2J)$  oder  $1/(4J)$ , je nach Art des NMR-Experimentes. Der Wert der  $^1J_{CC}$  Kopplung liegt mit 35 Hz deutlich höher als die  $^2J$  und  $^3J$  Kopplungskonstanten von einigen Hertz der Protonen. Deshalb kann der Mischprozess im HCCH-Experiment deutlich schneller erfolgen, und so sind die Verluste durch Relaxation während der Pulsdauer wesentlich geringer. NMR-Experimente, die  $C^\alpha$  und  $C^\beta$  Resonanzen



aufnehmen, können ebenfalls zur Identifizierung von Aminosäuren dienen, da diese chemischen Verschiebungen für bestimmte Aminosäuren charakteristisch sind.

### 2.6.6 Berechnung der Proteinstruktur

Bei den NOE(NuclearOverhauserExchange)-Signalen unterscheidet man solche, bei denen Protonen nicht weiter als vier Aminosäuren voneinander entfernt (medium range NOE), und solche, bei denen sie mehr als fünf Aminosäuren getrennt sind (long-range NOE). Die medium-range NOE's dienen zur Bestimmung der Sekundärstrukturelemente und der Konformation des Proteinrückgrats, während die long-range NOE's zur Berechnung der Tertiärstruktur genutzt werden.

Helixstrukturen und  $\beta$ -Faltblätter zeichnen sich durch fest definierte Torsionswinkel aus und durch das Auftreten charakteristischer Kopplungsmuster aus. In  $\alpha$ -Helices sind starke NOE-Signale zwischen den Amidprotonen  $H^N(i)-H^N(i+1)$  und  $H^N(i)-H^N(i+2)$  zu erwarten und zwischen den  $H^\alpha(i)-H^N(i+3)$ . Für  $\beta$ -Faltblätter charakteristisch sind starke NOE-Signale für  $H^\alpha(i)-H^N(i+1)$  und außerdem alternierende  $H^\alpha(i)-H^\alpha(j)$  und  $H^N(i)-H^N(j)$  Signale zwischen den Strängen i und j.

Die Geschwindigkeit des Austausches von Amidprotonen gegen Deuterium liefert ebenfalls Hinweise auf das Vorliegen von Sekundärstrukturelementen. Wenn Wasserstoffbrückenbindungen vorhanden sind, ist die Austauschgeschwindigkeit deutlich verlangsamt. Das Protein wird lyophilisiert und anschliessend in  $D_2O$  aufgenommen. Wenn die Protonen gegen Deuterium austauschen, verschwinden die entsprechenden Signale im Spektrum. Diese Methode wird als **Amidprotonenaustausch-Spektroskopie** bezeichnet.

Auch die chemische Verschiebung von Protonen in bestimmten Sekundärstrukturelementen ist charakteristisch: zum Beispiel sind  $H^\alpha$ -Protonen in helicalen Strukturen eher bei hohem Feld (niedrigen ppm-Werten) zu finden, während die Verschiebung von  $H^\alpha$ -Protonen in  $\beta$ -Faltblättern bei tieferem Feld (höheren ppm-Werten) liegt.

Neben den Abstandsbedingungen aus den NMR-Experimenten gehen auch empirisch erhaltene Daten für die Bindungslängen der kovalent gebundenen Atome und ihre Bindungswinkel in die Berechnung der Proteinstruktur ein. Mit Hilfe dieser Informationen werden über das Programm X-PLOR Strukturen mit möglichst geringer Energie berechnet.

Für die Strukturanalyse des HsFdx wurde die Methode des „*simulated annealing*“ genutzt. Eine Startstruktur mit gestreckter Proteinkonformation, welche die empirischen Parameter

enthält, wird kurze Zeit simuliert auf hohe Temperaturen gebracht und dann durch Abkühlen unter dem Einfluß des Kraftfeldes  $V$  aus den empirischen und den experimentell erhaltenen Daten zu einer energetisch günstigen Struktur gebracht:

$$V = E_{\text{emp}} + E_{\text{eff}}$$

$E_{\text{emp}}$ : umfaßt alle Informationen über die Primärstruktur des Proteins und über die kovalenten Bindungen

$E_{\text{eff}}$ : mit Hilfe der NMR-Experimente experimentell bestimmte Randbedingungen

Die NMR-Spektroskopie liefert als Resultat eine Schar von Strukturen. Konvergiert die Strukturberechnung, erhält man als Ergebnis eine gewisse Anzahl von Strukturen mit geringer, ähnlicher Energie. Die anderen Strukturen zeichnen sich dadurch aus, dass ihre Energie deutlich höher liegt. Für die Strukturdarstellung wird eine Überlagerung der Modelle mit geringer Energie verwendet. Die Qualität der Struktur wird anhand der mittleren Abweichung („*rmsd*“ root mean square deviation-Wert) der Atompositionen in den verschiedenen Strukturmodellen beurteilt.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Teil A: Stabilitäts- und NMR-Messungen am HsFdx

Für die Strukturberechnung von Proteinen kann zum einen die Kristallstrukturanalyse genutzt werden, welche die Festkörperstruktur liefert. Zum anderen kann mit Hilfe der NMR-Spektroskopie die Struktur eines Proteins in Lösung bestimmt werden. Da im Rahmen dieser Arbeit die halophilen Eigenschaften des Ferredoxins aus *H. salinarum* (HsFdx) untersucht werden sollten, und es sich bei der Halophilie um ein Phänomen handelt, das in Lösung auftritt, wurde die NMR-Spektroskopie gewählt. Sie macht eine Strukturbestimmung unter physiologischen Bedingungen möglich, während die Kristallographie auf die speziellen Bedingungen angewiesen ist, unter denen das Protein kristallisiert. Die NMR-Strukturanalyse erlaubt darüber hinaus eine Variation der Pufferbedingungen. Außerdem können Untersuchungen zur Dynamik des Proteins durchgeführt werden.

Um NMR-Spektren ausreichender Qualität von HsFdx zu erhalten, mußte zuerst eine Aufreinigungsstrategie für das Protein entwickelt werden. Des weiteren mußten Bedingungen gefunden werden, unter denen das Ferredoxin ausreichend stabil für Langzeit-NMR-Messungen ist. Im Folgenden werden zunächst die Ergebnisse aus den Stabilitäts- und Faltungsuntersuchungen am HsFdx vorgestellt. Anschließend wird die Strukturanalyse auf der Basis der NMR-spektroskopischen Daten präsentiert.

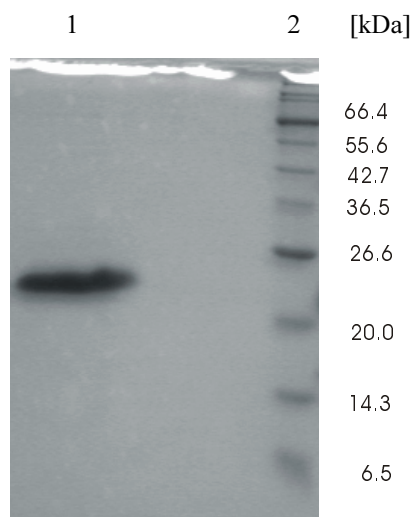
#### 3.1.1 Isolierung und Aufreinigung des Ferredoxins aus *H. salinarum*, HsFdx

Für die Isolierung des HsFdx wurden die halobakteriellen Wildtypstämme RI und S9 des *H. salinarum* verwendet, wenn parallel zur HsFdx Aufreinigung das Protein Bakteriorhodopsin (BR) gewonnen werden sollte. Ansonsten wurde der Stamm Snob verwendet, dessen BR-Gen deletiert ist. Die Sequenzierung des *H. salinarum* Genoms ergab, dass neben dem HsFdx noch weitere Ferredoxine im Genom codiert sind (Pfeifer et al., 1993), (Ng et al., 2000), (Oesterhelt, D. et al., unveröffentlicht), deren Funktion Gegenstand derzeitiger Untersuchungen ist.

Da HsFdx konstitutiv exprimiert wird, und die Sauerstoffzufuhr keinen Effekt auf das Expressionsniveau des Proteins hat, wurden die *H. salinarum* Zellen für die HsFdx Isolierung zu Beginn der stationären Phase geerntet (Kerscher, 1976).

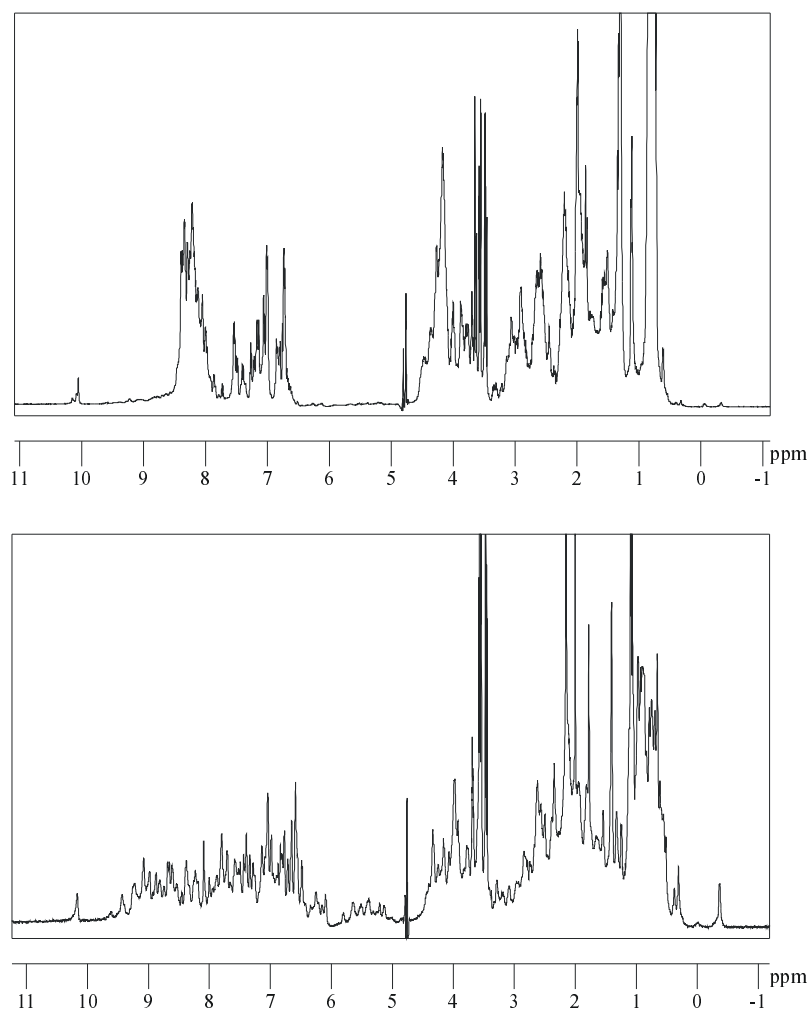
Das Molekulargewicht von HsFdx beträgt 14.6 kDa. Das Ferredoxin, welches nach der Methode von Kerscher aufgereinigt wurde, zeigte eine homogene Bande im SDS Gel auf einer Höhe von etwa 21-22 kDa (Abbildung 11). Dieses ungewöhnliche Laufverhalten halophiler Proteine in der Gelelektrophorese ist auf den stark erhöhten Anteil negativer Ladungen zurückzuführen (Werber & Mevarech, 1978a).

**Abbildung 11: SDS-PAGE (15%) von HsFdx.** 1: HsFdx, 2: MW



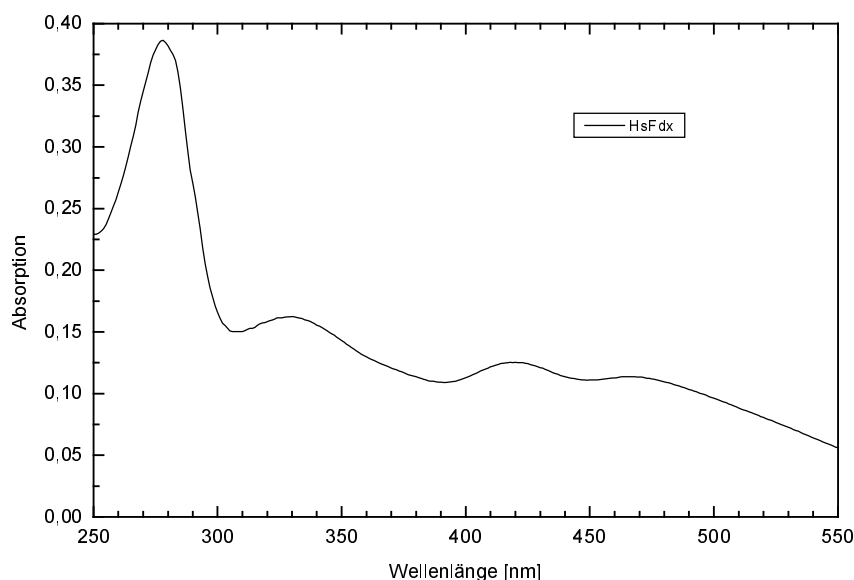
Erste NMR-spektroskopische Untersuchungen des HsFdx ergaben, dass neben dem nativen Holoprotein das HsFdx noch in einer anderen Konformation vorliegt (Abbildung 12). Sowohl die 1D-<sup>1</sup>H-NMR-Spektren als auch CD-Spektren des HsFdx mit einem Absorptionsverhältnis von 0.25 deuten darauf hin, dass es sich bei der Verunreinigung um größtenteils entfaltetes HsFdx handelt. Die Signale der Verunreinigung, welche vor allem im Bereich von 7.5-9.0 ppm zu sehen sind, sind deutlich stärker als die Resonanzen des Holo-HsFdx (Abbildung 12 oberer Bereich im Vergleich zum Spektrum im unteren Bereich). Die Signalintensität von Kernen ist deutlich geringer, wenn sie sich in einer starren Konformation befinden, als wenn sich ihre chemische Umgebung rasch ändert (siehe Diskussion). Bei den chemischen Verschiebungen von 7.5-9.0 ppm befinden sich vor allem die Signale der Amidprotonen, deren Zuordnung für die Strukturanalyse essentiell ist. Die Überlagerung der Signale des Holo-HsFdx durch die des Proteins mit geringerem Sekundärstrukturanteil machten eine Zuordnung der Resonanzen des nativen HsFdx unmöglich. Deshalb mußte eine Aufreinigungsstrategie entwickelt werden, die eine Abtrennung des nicht nativen HsFdx ermöglicht, damit aussagekräftige NMR-Spektren erhalten werden konnten.

**Abbildung 12: 1D-<sup>1</sup>H-Spektren von HsFdx Lösungen mit unterschiedlichem Absorptionsverhältnis.** Oben ist das 1D-<sup>1</sup>H-NMR Spektrum von HsFdx mit einem Absorptionsverhältnis von  $A_{420\text{nm}}/A_{280\text{nm}} = 0.25$  zu sehen. Unten ist das 1D-<sup>1</sup>H-NMR Spektrum von HsFdx mit  $A_{420\text{nm}}/A_{280\text{nm}} = 0.33$  abgebildet.



Mit Hilfe der denaturierenden Acrylamid-Gelelektrophorese konnten Holo- und nicht natives HsFdx nicht unterschieden werden. Deshalb wurde zur Bewertung der Reinheit des Holo-HsFdx das Absorptionsverhältnis  $A_{420\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$  genutzt. Der Eisen-Schwefel-Komplex absorbiert im sichtbaren Bereich bei 420 nm und 467 nm (Abbildung 13). Die Absorption der aromatischen Reste bei 280 nm ist ein Maß für die Proteinkonzentration. Wird das Ferredoxin denaturiert, ist eine Bindung des 2Fe-2S-Cluster über die vier Cysteine nicht mehr möglich. Der Cluster zerfällt in seine Bestandteile, was eine Abnahme der Absorption bei 420 nm und 467 nm mit sich bringt. Somit kann das  $A_{420\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$  Verhältnis als Maß für den Anteil an Holoprotein herangezogen werden.

**Abbildung 13: Absorptionsspektrum einer 125  $\mu$ M Lösung des aufgereinigten HsFdx mit einem Absorptionsverhältnis  $A_{420\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$  von 0.3.** Absorptionsmaxima bei 280 nm, 330 nm, 420 nm und 467 nm.



Die Aufreinigung nach dem Kerscher-Protokoll lieferte HsFdx mit  $A_{420\text{nm}}/A_{280\text{nm}} = 0.25$ . Um nicht natives HsFdx abzutrennen, wurde zusätzlich zur Anionenaustauschchromatographie eine Ammoniumsulfatfällung durchgeführt. Außerdem wurde eine speziell für halophile Proteine entwickelte Aufreinigung genutzt, die eine hydrophobe Chromatographie über eine Sepharose4B-Säule vorsieht, welche mit einem Ammoniumsulfatgradienten entwickelt wurde (Eisenberg et al., 1992), (Haar, 1976), (Werber & Mevarech, 1978b). Nach den zusätzlichen Reinigungsschritten konnte HsFdx mit einem Absorptionskoeffizienten  $A_{420\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$  von 0.33 gewonnen werden. Durch NMR-Spektroskopie wurde empirisch festgestellt, dass eine Zuordnung der Signale des HsFdx möglich ist, wenn das Absorptionsverhältnis  $A_{420\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$  des Proteins größer als 0.3 war (Abbildung 12). Durch Optimierung und Erweiterung der Aufreinigungsmethode konnte HsFdx somit in ausreichender Reinheit erhalten werden.

NMR-Messungen erfordern darüber hinaus, dass die Probe über den Zeitraum der Messungen stabil ist (etwa eine Woche). Zu diesem Zweck mußten Bedingungen für HsFdx gefunden werden, unter denen das Ferredoxin diese Voraussetzung erfüllt.

### 3.1.2 Stabilitätsmessungen am HsFdx in Abhängigkeit von der Salzkonzentration

#### 3.1.2.1 Überblick über Methoden für Stabilitätsmessungen

Es gibt verschiedene Methoden, die Stabilität des nativen Zustandes eines Proteins zu untersuchen, welche sich in dem Betrag der freien Energie ( $\Delta G_{N \leftrightarrow U}$ ) des Übergangs von der nativen zur denaturierten Konformation ausdrückt. Zum einen kann die Temperatur bestimmt werden, bei der sich ein Protein entfaltet. Je höher die Temperatur, bei der dieser Prozeß stattfindet, desto stabiler ist das gefaltete Protein. Zum anderen können anhand der zur Entfaltung benötigten Mengen an denaturierenden Reagenzien wie Guanidiniumhydrochlorid oder Harnstoff Aussagen über  $\Delta G_{N \leftrightarrow U}$  getroffen werden.

Die Entfaltung eines Proteins selbst kann mit Hilfe unterschiedlicher Techniken verfolgt werden.

Im aktiven Zentrum des HsFdx befindet sich ein 2Fe-2S Cluster, ein Chromophor, der über vier Cysteine an das Proteinrückgrat gebunden ist. Da die Entfaltung des Ferredoxins von dem Zerfall des Eisen-Schwefel-Komplexes begleitet wird, kann mit Hilfe der Absorptionsspektroskopie die Denaturierung des Proteins verfolgt werden. Für Proteine ohne Chromophor kann statt der Absorption die Fluoreszenzintensität von Tryptophanresten gemessen werden. Diese ist abhängig davon, ob sich der Tryptophanrest in einer hydrophilen oder hydrophoben Umgebung befindet.

Die Wärmekapazität  $C_p$  eines Proteins ändert sich beim Übergang vom nativen zum entfalteten Zustand, da bisher im Kern abgeschirmte hydrophobe Reste in die wässrige Umgebung gelangen und hydratisiert werden. Die Wärmekapazität eines Proteins kann mit Hilfe der *Differential Scanning Calorimetry* (DSC) gemessen werden. Eine weitere Technik ist die CD Spektroskopie, welche über die maximale Änderung des Anisotropiewertes im Augenblick der Entfaltung aufzeigt, unter welchen Bedingungen ein Protein denaturiert wird. Wenn die Entfaltung eines Proteins über stabile Zwischenstufen verläuft, kann die Konformation der jeweiligen Faltungsintermediate NMR-spektroskopisch untersucht werden. Anhand der Intensitätsänderung der NMR-Signale kann außerdem die Zeitabhängigkeit der Denaturierung eines Proteins verfolgt werden.

### 3.1.3 UV-VIS spektroskopische Untersuchungen von HsFdx

#### 3.1.3.1 Bestimmung der optimalen Probenzusammensetzung für die Aufnahme der NMR-Spektren des HsFdx

Mit Hilfe der Absorptionsspektroskopie wurde die Stabilität des HsFdx bei Raumtemperatur in Abhängigkeit von der Salzkonzentration und dem pH-Wert der Lösung gemessen, um die optimalen Bedingungen für die Aufnahmen der NMR-Spektren zu ermitteln. Die Proteinproben müssen zu diesem Zweck über mindestens eine Woche ein konstantes  $A_{420\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$  Verhältnis aufweisen. Zusätzlich erschweren hohe Salzkonzentrationen die NMR-Spektrenaufnahme durch Störung des Magnetfeldes. Deshalb war eine NMR-Messung unter Hochsalzbedingungen (d. h. mit 4.3 M NaCl) mit dem vorhandenen Probenkopf des Spektrometers nicht möglich. Idealerweise sollte eine NaCl Konzentration von 0.5 M in der zu messenden Probe nicht überschritten werden. Ebenso sollte der pH Wert unter 6.5 liegen, da der Protonierungszustand des Proteins für die Aufnahme der  $^1\text{H}$ -Spektren wichtig ist. Andererseits sind Ferredoxine säurelabil. Insofern mußte ein geeigneter Kompromiß gefunden werden, um auf der einen Seite aussagekräftige NMR-Spektren zu erhalten und auf der anderen Seite eine ausreichende Stabilität des Ferredoxins über den Meßzeitraum zu gewährleisten.

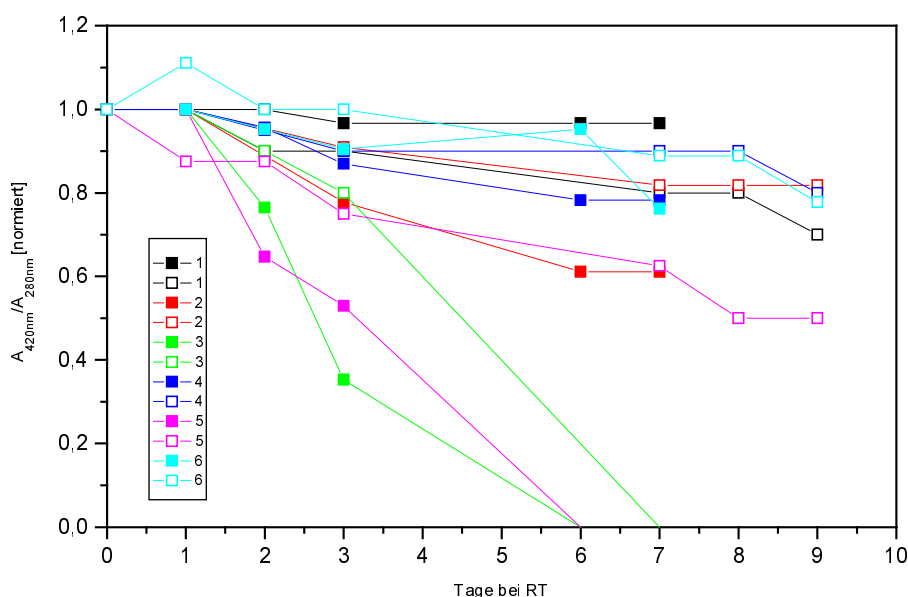
Die Stabilität des HsFdx bei Raumtemperatur wurde in folgenden Puffern bestimmt, um die optimalen Meßbedingungen für die Aufnahme der NMR-Spektren bestimmen zu können (Tabelle 2).

**Tabelle 2: Zusammensetzung der Probenpuffer.**

Probe	1	2	3	4	5	6
$c_{\text{NaCl}}[\text{M}]$	0.49	0.45	0.05	0.45	0.05	0.45
pH	6.5	6.5	6.5	6.0	6.0	6.3
$c(\text{Na}_x\text{H}_y\text{PO}_4) [\text{M}]$	0.01	0.05	0.01	0.05	0.01	0.05



**Abbildung 14: Absorptionsverhältnis von HsFdx Proben unterschiedlicher Salzkonzentration in Abhängigkeit von der Zeit.** Bestimmung der Stabilität des HsFdx bei Raumtemperatur in Puffern, die für die Aufnahme von NMR-Spektren geeignet sind. Die Messungen wurden mit je 600 µl einer 100 µM Lösung des HsFdx durchgeführt. Die zugehörigen Pufferzusammensetzungen sind der Tabelle 1 zu entnehmen. Das Absorptionsverhältnis  $A_{420\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$  des HsFdx in verschiedenen Probenpuffern ist in Abhängigkeit von der Inkubationszeit bei Raumtemperatur aufgetragen. Die Messungen wurden jeweils zweimal durchgeführt (offene und geschlossene Zeichen).



Wiederholte Messungen führten zu leicht unterschiedlichen Ergebnissen bei gleichen Pufferbedingungen, jedoch waren deutliche Trends zu erkennen (Abbildung 14). Die Proben, deren Absorptionsverhältnis sich schon innerhalb der ersten zwei bis drei Tage deutlich änderte (3 und 5), enthielten jeweils 50 mM NaCl. Die Absorption bei 420 nm des HsFdx in Gegenwart von 450 und 490 mM NaCl (Proben 1, 2, 4 und 6) fiel innerhalb von zwei Tagen um höchstens 10% ab, auch nach einer Woche war in fast allen Fällen ein Rückgang der Absorption bei 420 nm von maximal 20% zu beobachten. Die meisten 2D-NMR-Messungen können innerhalb von 24-48 h abgeschlossen werden. In diesem Zeitraum geht das Absorptionsverhältnis einer HsFdx Probe in Gegenwart von 0.45-0.49 M NaCl und pH 6.0-6.5 von ursprünglich 0.33 nur auf 0.30 zurück, eine Zuordnung der NMR-Signale ist somit möglich. Die Resonanzen weiterer Spektren, die nach diesen 48 h aufgenommen wurden, konnten gegen die Signale des ersten Spektrums abgeglichen werden, d.h. die störenden Signale des nicht nativen Proteins wurden subtrahiert.

### 3.1.3.2 Temperaturabhängige Denaturierung des HsFdx

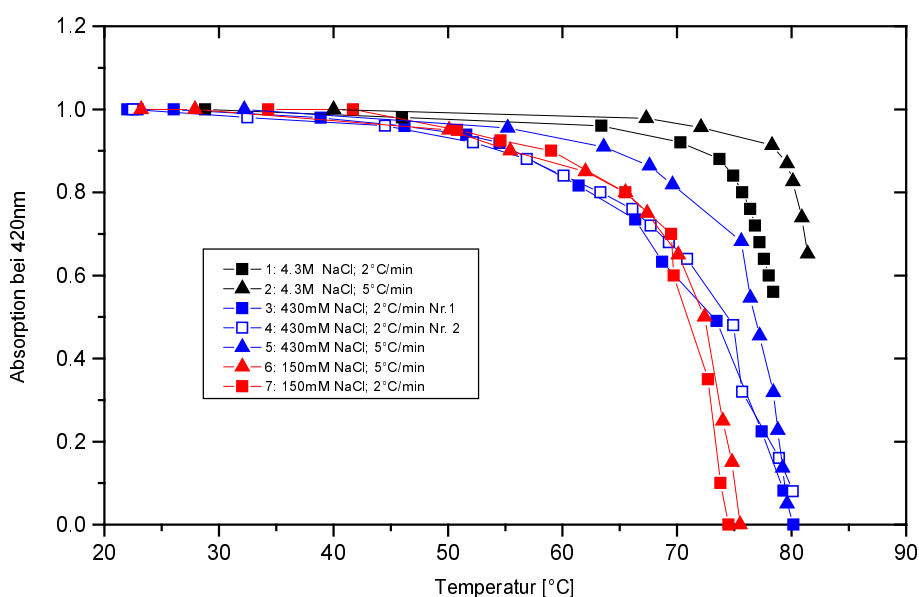
Ein Maß für die Stabilität eines Proteins ist die Temperatur  $T_m$ , bei welcher der Übergang von der nativen zur ungefalteten Form stattfindet. Um die bei Raumtemperatur beobachteten Trends zu verifizieren, wurden für temperaturabhängige Messungen die Proben mit etwa 2 °C/min erwärmt und UV-VIS-spektroskopisch der Zerfall des 2Fe-2S Clusters studiert (Abbildung 15).

Es konnten zwei Effekte beobachtet werden:

Zum einen ging die Absorption des 2Fe-2S Clusters bei 420 nm in einem Puffer mit 150 mM NaCl bei 75 °C auf Null zurück, während die Probe in 430 mM NaCl erst bei 80 °C völlig entfärbt vorlag. Die Absorption  $A_{420nm}$  von HsFdx in Hochsalzpuffer sank erst bei Temperaturen oberhalb von 70 °C, wohingegen die Denaturierung der beiden anderen Proben, deren Salzkonzentration geringer war, schon bei etwa 50 °C begann. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass je größer die Salzkonzentration in der Lösung war, desto höher die Temperaturen waren, bei der die Denaturierung des HsFdx begann und bei welcher sie abgeschlossen war. Zum anderen wurde in Hochsalz nur eine unvollständige Entfaltung des Holoproteins über den beobachteten Temperaturbereich detektiert.

Zur Untersuchung der Kinetik der Denaturierung wurden temperaturabhängige Absorptionsmessungen mit unterschiedlicher Aufheizgeschwindigkeit (2 °C/min und 5 °C/min) durchgeführt.

**Abbildung 15: Absorption des HsFdx bei 420 nm in verschiedenen Puffern in Abhängigkeit von der Temperatur.** Die Messungen wurden mit je 600 µl einer 100 µM Lösung des HsFdx durchgeführt.

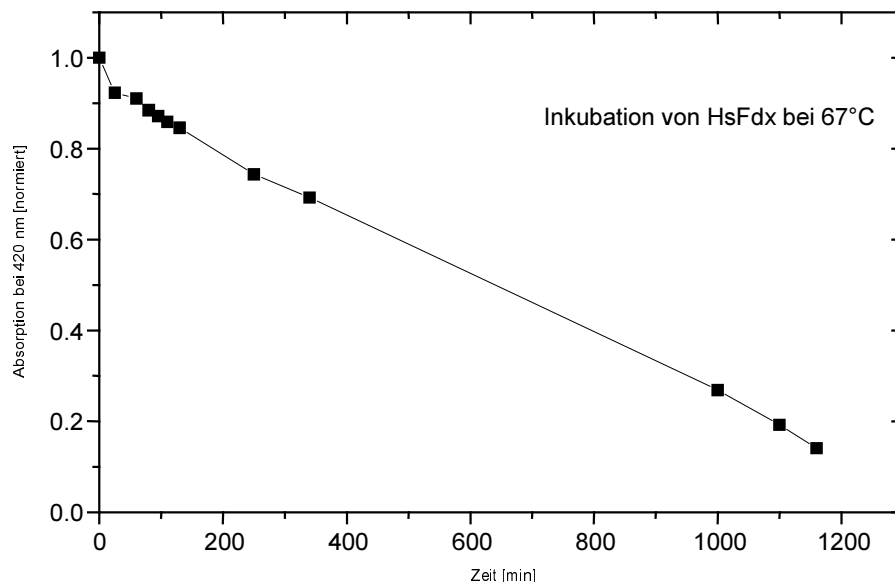


Der temperaturabhängige Absorptionsverlauf des HsFdx war nur in 150 mM NaCl unabhängig von der Aufheizgeschwindigkeit. Während der Messung fand eine vollständige Denaturierung statt. Wiederholte Messungen (3 und 4) ergaben einen gut übereinstimmenden Kurvenverlauf. In 430 mM NaCl wies der temperaturabhängige Absorptionsverlauf des HsFdx bei verschiedenen Aufheizgeschwindigkeiten signifikante Unterschiede auf. Erfolgte die Probenerwärmung mit 2 °C/min (Nr. 4), begann schon bei etwa 50 °C eine Abnahme der Absorption bei 420 nm, während eine Temperaturerhöhung mit 5 °C/min (Nr. 5) erst oberhalb von 55 °C dazu führte. Auch die Absorptionsabnahme der Probe in 150 mM NaCl begann ebenfalls erst bei etwa 50 °C. In Gegenwart von 4.3 M NaCl sank die Absorption bei 420 nm bei schnellerem Aufheizen erst bei deutlich höheren Temperaturen. Dies deutet auf darauf hin, dass die Zersetzung der Probe ab 430 mM NaCl langsamer erfolgt als die Temperaturänderung (5 °C/min). Das System befand sich während der Messung nicht in einem thermischen Gleichgewicht.

### 3.1.3.3 Zeitabhängigkeit des Clusterzerfalls von HsFdx

Weiterhin wurden die Halbwertszeiten der Denaturierung des HsFdx bei Temperaturen um 65 °C in Abhängigkeit von der Salzkonzentration untersucht. Die Temperatur der Probe wurde in 10 °C Schritten erhöht und jeweils so lange konstant gehalten, bis keine Änderung der Absorption bei 420 nm mehr auftrat. Bis zu einer Probentemperatur von 57 °C zeigte sich innerhalb von einer halben Stunde keine Änderung der Absorption bei 420 nm. Erst bei einer Temperatur oberhalb von 67 °C konnte eine Entfaltung des HsFdx spektroskopisch nachgewiesen werden (Abbildung 16). Da die Entfaltung sehr langsam erfolgte, scheint eine starke kinetische Hemmung der Reaktion  $\text{HsFdx}_{\text{nativ}} \leftrightarrow \text{HsFdx}_{\text{denaturiert}}$  vorzuliegen. Dagegen fand die vollständige Entfaltung von HsFdx in Gegenwart von 430 mM NaCl in 10 mM Phosphatpuffer, pH 7.3 bei einer Temperatur von 65 °C schon innerhalb von 20 min statt. In Gegenwart von 150 mM NaCl erfolgte sie bereits innerhalb weniger Minuten. Eine erhöhte Salzkonzentration bewirkte somit eine beachtliche Stabilisierung des HsFdx.

**Abbildung 16:** Absorption einer 80  $\mu\text{M}$  Lösung von HsFdx in 4.3 M NaCl, 10 mM Phosphatpuffer, pH 7.3, in Abhängigkeit von der Inkubationszeit bei 67 °C.



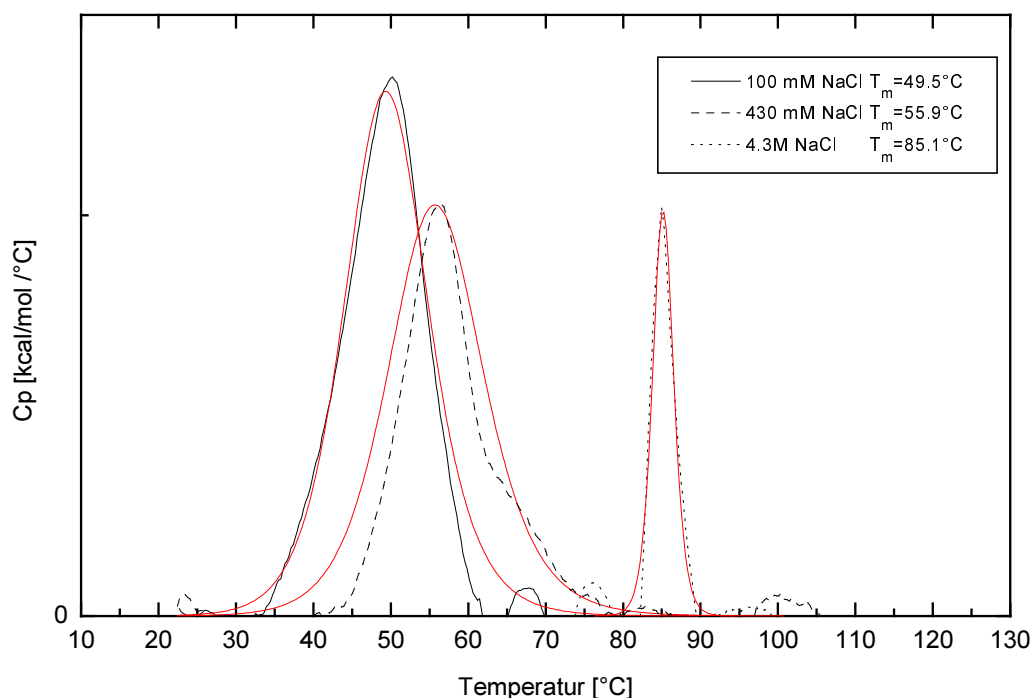
Der Clusterzerfall von HsFdx in einem Puffer mit 150 bzw. 430 mM NaCl ging nicht mit einer Trübung der Probe einher. Das Protein ist bei diesen Salzkonzentrationen also auch in der Apo-Form löslich. Unter Hochsalzbedingungen wurde beobachtet, dass Ferredoxin als farblose Substanz ausfiel.

### 3.1.4 DSC und CD Messungen: Übergangstemperaturen der Entfaltung des HsFdx in Abhängigkeit von der Salzkonzentration

Mit Hilfe der UV-VIS-Spektroskopie kann nur der Zerfalls des Eisen-Schwefel-Clusters verfolgt werden. DSC Messungen hingegen ermöglichen eine genaue Bestimmung der Temperatur  $T_m$ , bei der ein Protein seine definierte zwei- und dreidimensionale Struktur verliert (Abbildung 17). Anhand der Wärmekapazität können bei einer reversiblen Faltungs-, Entfaltungskurve außerdem thermodynamische Parameter wie Enthalpie  $\Delta H_{U \leftrightarrow N}$  und freie Energie  $\Delta G_{U \leftrightarrow N}$  der Faltungsreaktion bestimmt werden. Der Zerfall des Eisen-Schwefel-Clusters war irreversibel. Trotzdem konnten die  $T_m$ -Werte zum qualitativen Vergleich der Stabilitäten des Proteins in verschiedenen Lösungen herangezogen werden (Remmele et al., 1998).

Die  $T_m$  wurde für HsFdx in Lösungen mit 100 mM, 430 mM und 4.3 M NaCl bei einem pH Wert von 7.3 bei einer Aufheizgeschwindigkeit von  $1^\circ\text{C}/\text{min}$  bestimmt (Abbildung 17). In Gegenwart von 100 mM NaCl liegt die  $T_m$  von HsFdx mit  $49.5^\circ\text{C}$  um  $6.5^\circ\text{C}$  niedriger als die  $T_m$  in einer Lösung mit 430 mM NaCl. Für HsFdx in 4.3 M NaCl wurde ein Übergang bei  $85^\circ\text{C}$  beobachtet.

**Abbildung 17: DSC Spektren von HsFdx.** Die Salzkonzentration in Lösungen betrug 100 mM, 430 mM und 4.3 M NaCl. Die Messungen wurden bei einer Temperaturerhöhung von  $1^\circ\text{C}/\text{min}$  durchgeführt. Die Proteinkonzentration lag bei etwa  $20\ \mu\text{M}$ , die Spektren wurden normiert. Der gemessene Kurvenverlauf ist in rot dargestellt, die theoretisch für die Denaturierung berechneten Kurven in schwarz (siehe Material und Methoden).



Mit Hilfe der CD-Spektroskopie kann ebenso wie bei den DSC-Messungen die Temperatur bestimmt werden, bei der die größte Änderung der Sekundärstruktur stattfindet. Diese Meßmethode ist allerdings nicht bei hohen NaCl Konzentrationen anwendbar, da die intrinsische Absorption des Salzes ein Problem bei der Auswertung der Ergebnisse darstellt.

**Tabelle 3: Vergleich der  $T_m$ 's für HsFdx aus DSC und CD Messungen in Abhängigkeit von der Salzkonzentration.**

Salzkonzentration\Methode	DSC ( $T_m$ )	CD ( $T_m$ )
100 mM NaCl	49.5 °C	49 °C
430 mM NaCl	56 °C	56 °C
4.3 M NaCl	85°C	-

Beide Meßmethoden lieferten vergleichbare Meßwerte für HsFdx in Gegenwart von 100 mM bzw. 430 mM NaCl (Tabelle 3). Die Steigerung der  $T_m$  mit der Salzkonzentration steht für eine deutliche Stabilisierung des Proteins bei höheren NaCl-Konzentrationen.

### 3.1.5 Rekonstitution des Apo-HsFdx mit dem Eisen-Schwefel-Clusters

Bei der heterologen Expression von Ferredoxinen in *E. coli* wurde festgestellt, dass der Einbau des Eisen-Schwefel-Clusters der geschwindigkeitsbestimmende Schritt bei der Synthese dieser Proteine ist. In einigen Organismen wurden Operons identifiziert, die Proteine codieren, welche den Einbau von Eisen-Schwefel Komplexen katalysieren (Nakamura et al., 1999). Deshalb liefert die Expression vieler Ferredoxine ohne gleichzeitige Überexpression des *isc*-Operons („*iron sulfur cluster*“) in *E. coli* lediglich die Apoproteine (Cheng et al., 1995; Xia et al., 1996). Die entsprechenden Gene des *isc*-Operons konnten auch im Genom des *H. salinarum* identifiziert werden (*nifS*-OE4463F, *nifU*-OE4465F). Die beiden Gene *nifS* und *nifU* bilden ein Operon, allerdings liegen sie nicht in der Nähe des *fdx*-Gens, wie es z.B. in *A. vinelandii* der Fall ist (Zheng et al., 1998). Den Proteinen NifS und NifU wird eine Rolle bei der Bildung und der Reparatur von Eisen-Schwefel-Clustern zugeschrieben, auch wenn ihre genaue Funktion bisher nicht geklärt ist.

Bei der Überexpressionen von Ferredoxinen wurde häufig nur ein geringer Teil „*in vivo*“ als Holoprotein erhalten, deshalb wurden „*in vitro*“ Rekonstitutionen der Eisen-Schwefel-Cluster etabliert. Ausgehend von  $\text{FeCl}_3$ , Thiolatsalzen ( $\text{RS}^-$ ) und elementarem Schwefel gelang es, unterschiedliche  $\text{Fe}_x\text{-S}_y$ -Cluster zu synthetisieren (Berg & Holm, 1982), (Beinert et al., 1997). Das bedeutet, dass die Proteinstruktur nicht notwendig ist, damit sich die verschiedenen Eisen-Schwefel-Cluster bilden können. Des weiteren konnte gezeigt werden, dass die Rekonstitution einiger Apoproteine zum Holoprotein durch Zugabe von Eisen- und Sulfidionen unter reduzierenden Bedingungen möglich ist (Malkin & Rabinowitz, 1966).

Für die Faltungsstudien an HsFdx wurde ein Rekonstitutionsprotokoll etabliert, das an die von Suhara *et al.* beschriebene Rekonstitution von dem 2Fe-2S enthaltenden Rinder-Adrenodoxin (Adrenal Ferredoxin) angelehnt ist (Suhara et al., 1973). Zuerst wurde HsFdx durch Zugabe von Trichloressigsäure denaturiert und aus der Lösung ausgefällt. Der Niederschlag wurde in Trispuffer mit 8 M Harnstoff und 100 mM DTT resuspendiert, um noch vorhandene Sekundärstrukturelemente zu zerstören. Unter anaeroben Bedingungen wurden  $\text{Fe}^{2+}$  oder  $\text{Fe}^{3+}$  und  $\text{S}^{2-}$  in Form von  $\text{FeSO}_4$ ,  $\text{FeCl}_3$  und  $\text{Na}_2\text{S}$  zugegeben. Nach der Zugabe von Eisen- und Sulfidionen wurde die Probe gegen Trispuffer dialysiert, um eine Harnstoffkonzentration unter 0.5 M zu erreichen. Diese Dialyse wurde in Gegenwart unterschiedlicher Salzkonzentrationen durchgeführt. Die NaCl-Konzentration hatte einen entscheidenden Einfluß auf das Ausmaß, mit dem die Rückfaltung des halophilen Ferredoxins stattfand ( $A_{420\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$  vor Fällung und Rekonstitution 0.33) (Tabelle 4).

**Tabelle 4: Absorptionsverhältnis  $A_{420\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$  nach der Rekonstitution von HsFdx in Abhängigkeit von der Salzkonzentration.**

Faltungsexperiment	1	2	3	4	5
NaCl-Konzentration	0	0.15	0.43	2	4.3
$A_{420\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ nach Rekonstitution	0	0	0.2	0.33	0.33

Die salzabhängigen Faltungsstudien am HsFdx machten deutlich, dass die Rekonstitution des Holoproteins nur in Gegenwart von Salzkonzentrationen erfolgte, welche die für mesophile Organismen physiologische Konzentration deutlich übersteigen. In Gegenwart von 430 mM NaCl fand zwar eine Rückfaltung des HsFdx statt, aber das geringere Verhältnis von  $A_{420\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$  von 0.2 zeigte an, dass das Ferredoxin nicht oder nur zum Teil nativ gefaltet vorliegt. Erst unter Hochsalzbedingungen war eine vollständige Rekonstitution möglich.

### 3.2 NMR-Struktur des HsFdx

Zur Strukturaufklärung von Proteinen wird heutzutage in den überwiegenden Fällen die Röntgenstrukturanalyse (RSA) verwendet. Jedoch bleibt bei der Analyse der Festkörperstruktur eines Proteins immer zu bedenken, dass im Kristall unter den besonderen Kristallisationsbedingungen und aufgrund der dichten Packung der Proteine Kräfte und Wechselwirkungen auftreten können, die in Lösung nicht existieren. Da es sich bei der

Halophilie um eine Proteineigenschaft handelt, die in Lösung beobachtet wird, ist die RSA nicht die geeignete Methode, um dieses Phänomen zu studieren. Die NMR-Spektroskopie hingegen erlaubt die Untersuchung unter physiologischen Bedingungen.

Die Aufnahme und die Interpretation von NMR-Daten ist soweit fortgeschritten, dass die Strukturanalyse von Proteinen mit einem Molekulargewicht bis zu 15 kDa häufig anhand der 2D- $^1\text{H}$ -Spektren möglich ist. Für größere Proteine ist die Qualität und die Dispersion der  $^1\text{H}$ -Spektren entscheidend dafür, ob eine eindeutige Zuordnung der Signale erfolgen kann.

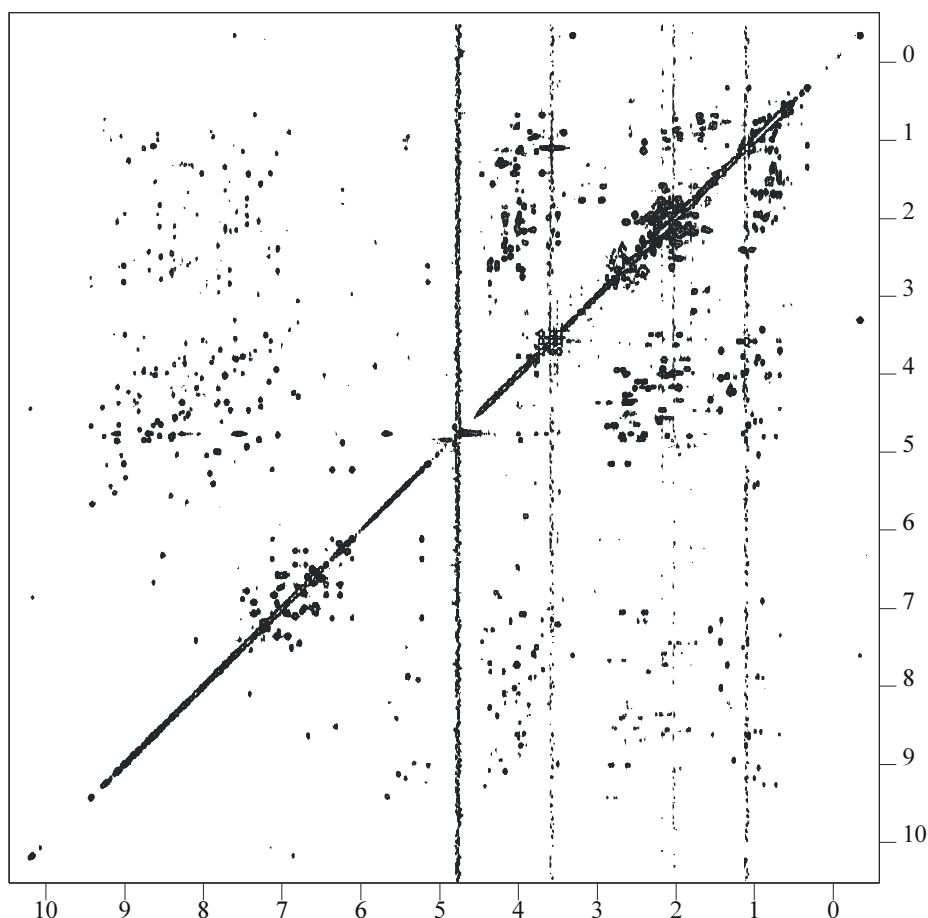
Jedoch kann durch die Aufnahme von NMR-Spektren des  $^{15}\text{N}$  und  $^{13}\text{C}$  markierten Proteins zum einen die Durchführung der Strukturberechnung deutlich beschleunigt werden, zum anderen kann eine wesentlich größere Anzahl an Distanzbeschränkungen für die Struktur ermittelt werden. Dies bringt eine verbesserte Qualität des Strukturmodells mit sich. Außerdem ermöglichte die Markierung des HsFdx eine *ab initio* Strukturbestimmung, ohne auf Informationen aus bekannten Kristallstrukturen zurückgreifen zu müssen.

### 3.2.1 Isotopenmarkierung von HsFdx

Mit einem Molekulargewicht von 14.6 kD und 128 Aminosäuren liegt die Größe des HsFdx im oberen Grenzbereich, bis zu der eine Strukturanalyse anhand der  $^1\text{H}$ -NMR Daten erfolgversprechend ist. Die 2D- $^1\text{H}$ -Spektren des HsFdx wiesen eine gute Dispersion der Signale auf, wie anhand des 2D- $^1\text{H}$ -TOCSY Spektrums zu erkennen ist (Abbildung 18). Die Kreuzresonanzen der Amidprotonen mit den Seitenkettenprotonen der sind über den ganzen Bereich von 7.5-9 ppm und 1.0-5.5 ppm verteilt.



**Abbildung 18: 2D- $^1\text{H}$ -TOCSY von HsFdx** .1 mM Protein in 450 mM NaCl, 10 mM Natriumphosphatpuffer, pH 6.5, T = 290 K.



Trotz der guten Dispersion konnte die NMR-Struktur des HsFdx nicht allein anhand der homonuklearen  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren analysiert werden. Dies liegt daran, dass nicht alle Kerne des HsFdx Signale im normalen Bereich der NMR-Spektren aufwiesen. Die Strukturanalyse anderer Ferredoxine hat gezeigt, dass der Paramagnetismus des oxidierten Eisen-Schwefel-Clusters bewirkt, dass die Signale von Protonen in der räumlichen Nähe des Clusters nicht im Bereich der normalen chemischen Verschiebungen detektiert werden können (Goodfellow & Macedo, 1999). Im reduzierten Zustand sind die Elektronen der beiden Eisenatome antiferromagnetisch gekoppelt. Der erste angeregte Zustand liegt jedoch energetisch so niedrig, dass er bei Raumtemperatur besetzt, und der Komplex somit paramagnetisch ist. Die fehlenden Resonanzen von clusternahen Protonen erschwerten die Zuordnung der übrigen NMR-Signale. Weitere Probleme ergaben sich aus der geringen Konzentration von 0.8 – 1.0 mM des HsFdx und daraus, dass die Messungen bei 290 K durchgeführt werden mußten, damit die Probe über den Meßzeitraum stabil war. Die niedrige Temperatur führte zu einem

schlechten Magnetisierungstransfer im TOCSY, d.h. viele Kreuzkorrelationen über mehr als drei Bindungen waren nicht zu beobachten und es konnten nicht für alle Aminosäuren die zugehörigen Spinsysteme erhalten werden. Für eine möglichst vollständige Zuordnung der detektierbaren Resonanzen war somit eine Isotopenmarkierung des HsFdx notwendig.

### 3.2.2 NMR-Daten für HsFdx

Die Aufnahme der NMR-Spektren erfolgte mit einem 600 MHz-NMR-Spektrometer DRX der Firma Bruker. Die Konzentration der HsFdx Proben betrug zwischen 0.8-1.0 mM in 450 mM NaCl, 10 mM Phosphatpuffer, pH 6.5.

Neben den homonuklearen Spektren wurden die folgenden mehrdimensionalen heteronuklearen NMR-Experimente durchgeführt. Auf der linken Seite sind die Abkürzungen für die Spektren angegeben, rechts werden die Kerne aufgeführt, die während des Experimentes angeregt und detektiert werden.

#### 2D-Experimente

$^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC	Amidproton $\text{H}_i$ - Amidstickstoff $\text{N}_i$
$^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ -HSQC	Proton - zugehöriger Kohlenstoff, z. B. $\text{H}_\alpha$ - $\text{C}_\alpha$

#### 3D-Experimente

HCCH-COSY	Der Magnetisierungstransfer findet ausschließlich über skalare J-Kopplung zwischen den Atomen statt: $\text{H}_\alpha$ - $\text{C}_\alpha$ - $\text{C}_\beta$ - $\text{H}_\beta$
HCCH-TOCSY	s. HCCH-COSY; zusätzlich $\text{H}_\alpha$ - $\text{C}_\alpha$ - $\text{C}_\beta$ - $\text{C}_\gamma$ - $\text{H}_\gamma$ etc.
CT-HSQC	<i>Constant Time</i> -Experiment zur Unterdrückung von Multiplettstrukturen

#### Tripelresonanzexperimente

HNHA	Amidproton $\text{H}_i$ - Amidstickstoff $\text{N}_i$ - $\alpha$ -Proton $\text{H}_\alpha$
HNCO	Amidproton $\text{H}_i$ - Amidstickstoff $\text{N}_i$ - Carbonylkohlenstoff $\text{C}_{i-1}$
HNCA	Amidproton $\text{H}_i$ - Amidstickstoff $\text{N}_i$ - $\alpha$ -Kohlenstoff $\text{C}_\alpha$ (und $\text{C}_{\alpha, i-1}$ als schwächere Resonanz)
HNCACB	Amidproton $\text{H}_i$ - $\alpha$ -Kohlenstoff $\text{C}_\alpha$ - $\beta$ -Kohlenstoff $\text{C}_\beta$
CBCA(CO)NH	$\beta$ -Kohlenstoff $\text{C}_\beta$ - $\alpha$ -Kohlenstoff $\text{C}_\alpha$ - (Carbonylkohlenstoff $\text{C}_i$ , nicht detektiert) - Amidstickstoff $\text{N}_{i+1}$

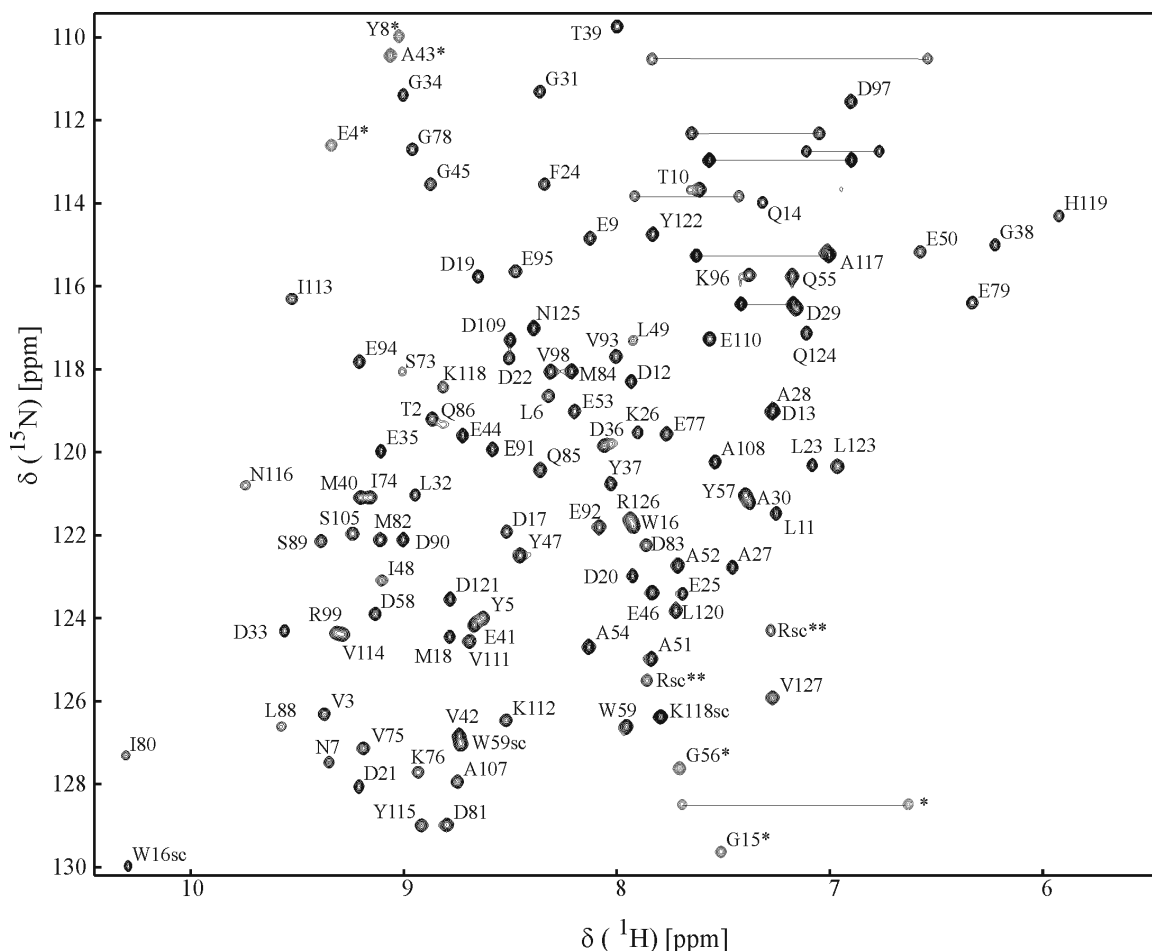
---

HBHA(CO)NH       $\beta$ -Proton  $H_\beta$  -  $\alpha$ -Proton  $H_\alpha$  - (Carbonylkohlenstoff  $C_i$ , nicht detektiert) -  
Amidstickstoff  $N_{i+1}$

Anhand der Tripelresonanzexperimente HNCO, HNCA, CBCA(CO)NH und HNCACB konnten 106 Amidresonanzen von den 128 Aminosäuren des Proteinrückgrates zugeordnet werden (siehe Material und Methoden), die drei Prolinreste besitzen keine Amidprotonen.

Im  $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum sind die Kreuzresonanzen der Amidprotonen mit den Amidstickstoffen zu erkennen. Neben den Signalen der Amide des Peptidrückgrats sind die Resonanzen der Seitenkettenamide zu sehen. In dem  $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum wurden die zugeordneten Amidprotonenresonanzen mit den zugehörigen Aminosäuren beschriftet (Abbildung 19). Für die Aminosäuren 60-72, 87 und 100-104 konnten keine Signale detektiert werden. Ein Vergleich mit der Kristallstruktur des homologen HmFdx legt nahe, dass diese Resonanzen aufgrund der Nähe der Aminosäuren zum paramagnetischen Eisen-Schwefel-Cluster nicht beobachtet werden können.

**Abbildung 19:**  $^1\text{H}, ^{15}\text{N}$ -HSQC Spektrum von  $^{15}\text{N}$ -HsFdx. Probe in 0.5 M NaCl, 10 mM Natriumphosphatpuffer, pH 6.5.



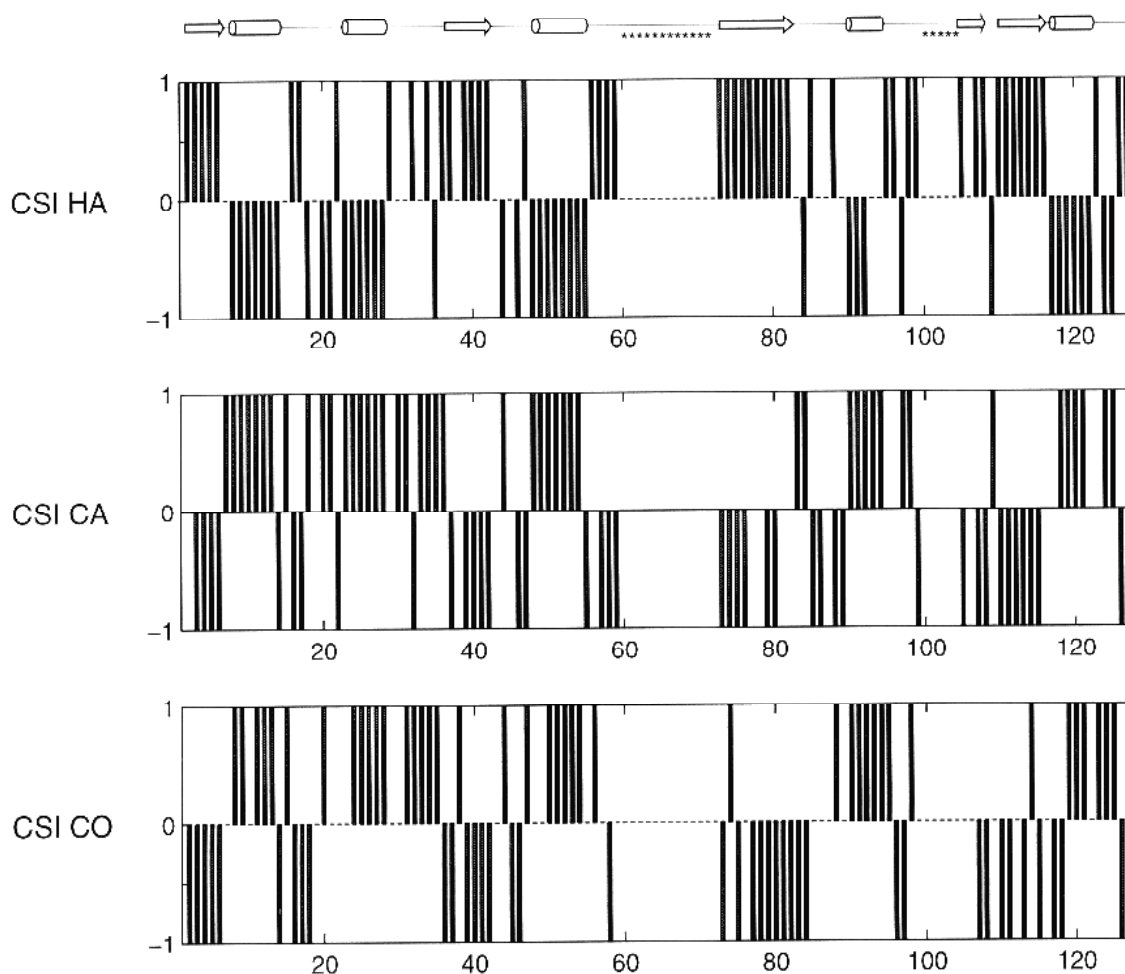
Für die Aminosäuren, deren Amidresonanzen identifiziert wurden, konnten die inter- und intraresiduellen  $\text{C}^\alpha$  und  $\text{C}^\beta$  Verschiebungen bestimmt werden. Außerdem konnten die Resonanzen der zugehörigen  $\text{H}^\alpha$  und 92% der  $\text{H}^\beta$  Atome zugeordnet werden.

Die Resonanzen der aromatischen Protonen konnten durch Analyse der 2D NOESY Spektren einer Probe in  $\text{D}_2\text{O}$  zugeordnet werden. Während der Messungen begann die langsame Zersetzung der Probe. Die starken Resonanzen des entfalteten Proteins stellten ein Problem bei der Identifizierung der Signale der aliphatischen Seitenketten dar. Deshalb konnten nur 80% der aliphatischen Protonen- und Kohlenstoffresonanzen zugeordnet werden (Schweimer et al., 2000). Die Zuordnung ist in der BioMagResBank unter der Zugriffsnummer 4444 hinterlegt.

Vorhersagen für Sekundärstrukturelemente wurden anhand der sekundären chemischen Verschiebungen der  $H_\alpha$ ,  $C_\alpha$  sowie der CO Resonanzen gemacht (Abbildung 20). Die Methode des *chemical shift index* (CSI) wurde von Wishart *et al.* vorgestellt. Sie wurde aufgrund der empirischen Beobachtung entwickelt, dass die Kerne abhängig von der umgebenden Sekundärstruktur unterschiedliche chemische Verschiebungen besitzen (Wishart et al., 1992). Die chemische Verschiebung der  $H_\alpha$  Protonen sind z.B. sind in einer  $\alpha$ -Helix im Vergleich zu ihrer chemischen Verschiebung im Knäuel (*random coil*) zu höherem Feld verschoben, während in  $\beta$ -Faltblättern die chemischen Verschiebungen der  $H_\alpha$  Protonen bei tieferem Feld liegen. So wird den chemischen Verschiebungen eine sekundäre Verschiebung (ein *Chemical Shift Index*, CSI) von +1, 0 und -1 zugeordnet, je nachdem, ob ihre Werte im Vergleich zu ihren Verschiebungen im Knäuel zu höherem, gar nicht oder zu tieferem Feld verschoben sind.

Demnach sind die Reste 2-6, 39-42, 74-82 und 110-113 voraussichtlich an der Ausbildung von  $\beta$ -Faltblättern beteiligt. Die Aminosäuren 8-13, 23-28, 48-54 und 90-94 könnten sich in  $\alpha$ -helikalen Bereichen befinden.

**Abbildung 20: CSI der  $H_\alpha$ -,  $C_\alpha$ - und CO-Atome von HsFdx.** Auftragung gegen die Sequenzposition der zugehörigen Aminosäure. Die aufgrund der CSIs getroffene Sekundärstrukturvorhersage ist oberhalb eingezeichnet (ein Pfeil für  $\beta$ -Faltblätter, ein Zylinder für  $\alpha$ -Helices). Die Sterne bezeichnen die Reste, deren Resonanzen aufgrund ihrer Nähe zum paramagnetischen Zentrum nicht beobachtet werden können.



Mit Hilfe der Amidprotonenaustauschspektroskopie konnten über das Austauschverhalten der Amidprotonen weitere Aussagen über Sekundärstrukturelemente gemacht werden. Das lyophilisierte Protein wurde in  $D_2O$  gelöst und nach 90 min waren noch 59 Signale im  $^1H$ ,  $^{15}N$  HSQC Spektrum detektierbar. Diese Resonanzen gehören entweder zu Amidprotonen, die an der Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen beteiligt sind, oder zu Amidprotonen in hydrophoben Bereichen, in denen kein Austausch von Wassermolekülen mit dem Lösungsmittel stattfindet.

Für Kerne in der Nähe des paramagnetischen 2Fe-2S Zentrums konnten keine NOE Signale erhalten werden. Dieses Problem kann durch unterschiedliche Ansätze gelöst werden (Goodfellow & Macedo, 1999): Zum einen können die Eisenatome können durch diamagnetische Metallatome ersetzt werden. Rekonstitutionsexperimente des Apo-HsFdx mit  $\text{GaCl}_3$  anstelle von  $\text{FeCl}_3$  lieferten jedoch kein natives Protein. Wenn anhand der NMR-Spektren keine Informationen über die Aminosäuren nahe zum aktiven Zentrum gewonnen werden kann, können Distanzbeschränkungen aus bekannten Strukturen homologer Proteinen verwendet werden. Deshalb wurden für die clusternahen Aminosäuren Distanzbeschränkungen und dihedrale Winkel der Kristallstruktur von HmFdx entnommen. Es sind einige Kristallstrukturen von Pflanzentypferredoxinen bekannt, die eine starke Konservierung der Struktur in Clusternähe aufweisen. Ihre Ähnlichkeit zu der Anordnung der Aminosäuren im HmFdx lassen den Schluß zu, dass auch der Clusterbereich von HsFdx analog aufgebaut ist. Für die NOE Signale wurden folgende Distanzbeschränkungen zugelassen: Für starke NOE Resonanzen wurde ein Abstand von bis zu 2.7 Å der wechselwirkenden Kerne zugelassen, für mittlere NOE Signale 3.5 Å und für schwache 5.0 Å. Die Anzahl der Distanzbeschränkungen setzt sich aus zugeordneten NOE-Resonanzen, Wasserstoffbrückenbindungen und Winkelbeschränkungen wie folgt zusammen:

**Tabelle 5: Übersicht der Distanzbeschränkungen, die aufgrund der NMR-Daten gewonnen werden konnten.**

NOE's:

Gesamt		1258
Intraresidual	( $ i-j =0$ )	393
Interresidual		
Sequentiell	( $ i-j =1$ )	336
"Medium range"	( $1 <  i-j  \leq 5$ )	195
"Long range"	( $5 <  i-j $ )	334
<hr/>		
Wasserstoffbrückenbindungen		46
$\phi$ Winkel		56

Zur Berechnung der Proteinstruktur aus den Abstandsbedingungen und Winkelbeschränkungen wurden zwei Ansätze gewählt. Der erste Ansatz (PDB-Datenbankeintrag 1EOZ)

enthielt neben den experimentell Abstandsbeschränkungen zusätzliche Randbedingungen für den clusternahen Bereich aus der Kristallstruktur von HmFdx.

In einem weiteren Ansatz wurde überprüft, ob die Bestimmung der clusterfernen Struktur des HsFdx ausschließlich mit den Daten aus den NMR-Messungen möglich war und ob die zusätzlichen Werte für den clusternahen Bereich hierfür nicht erforderlich waren. Es wurde ein zweiter Ansatz gerechnet, der ausschließlich Daten aus der Analyse der NMR-Spektren enthielt (PDB-Datenbankeintrag 1E10).

Für beide Ansätze wurden jeweils 60 Strukturmodelle berechnet.

Für 1EOZ wurden 20 Strukturmodelle aufgrund ihrer niedrigen Gesamtenergie und ihrer geringen Anzahl an Distanzverletzungen ausgewählt. Diese Strukturschar besitzt einen *rmsd* Wert von 0.81 Å für das gesamte Proteinrückgrat und 0.67 Å im clusterfernen Bereich.

Die zweite Methode lieferte 20 Strukturen für 1E10. Die Abweichung der C<sub>α</sub> Atome, die in diesem Fall ohne Beschränkungen für den Bereich um den Eisen-Schwefel-Komplex berechnet wurden, liegt bei 0.80 Å. Die Überlagerung der mittleren Strukturen der beiden Rechnungen besitzt einen *rmsd* Wert von 0.9 Å für die Rückgratatome, der Vergleich der clusterfernen Bereiche liefert einen *rmsd* Wert von 0.43 Å. Das Strukturmodell 1EOZ, welches mit zusätzlichen Werten für clusternahe Aminosäuren gerechnet wurde, besitzt zwar einen um 0.13 Å kleineren *rmsd* Wert für die clusterferne C<sub>α</sub> Spur, aber die Berechnung der Struktur von HsFdx in Lösung war unabhängig von der Kenntnis der Kristallstruktur von HmFdx erfolgreich. Allein anhand der Informationen aus den NMR-Messungen konnten Sekundär- und Tertiärstruktur des clusterfernen Bereichs, zu dem auch die halophile Extra-Domäne aus den Helices α' und α'' gehört, vom HsFdx mit guter Auflösung berechnet werden.

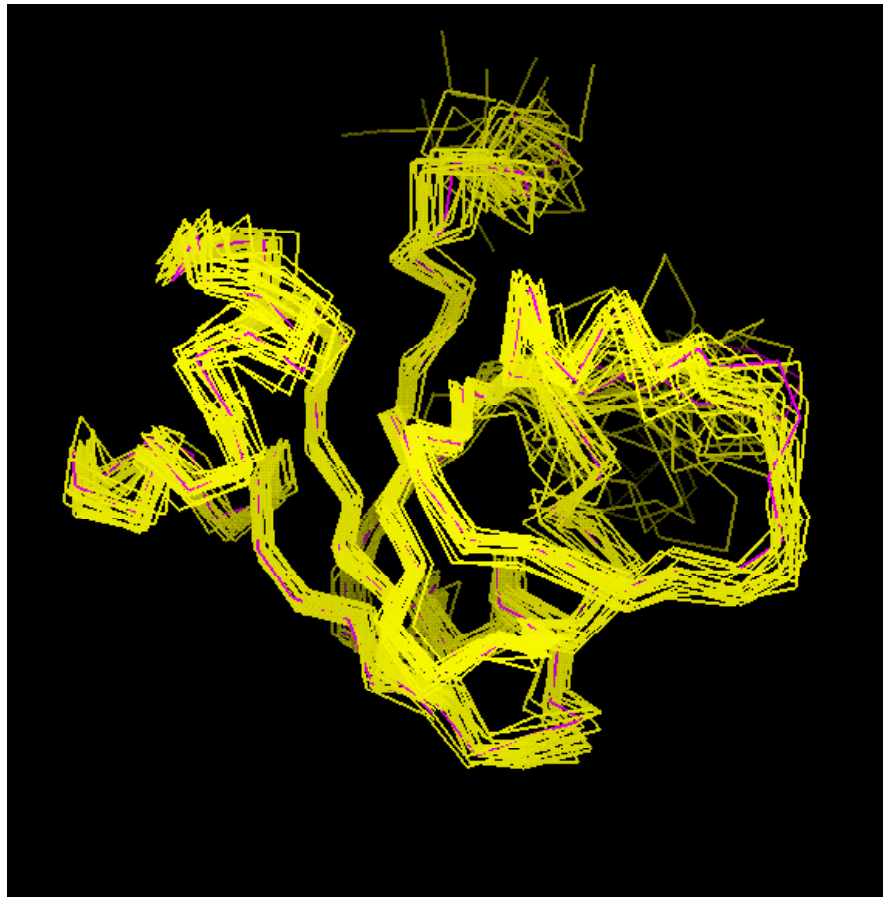
Um die Änderung der Struktur des HsFdx mit der Salzkonzentration zu untersuchen, wurden ebenfalls Spektren von HsFdx in 1.5 M NaCl aufgenommen. Es konnte keine Verschiebung der Resonanzen festgestellt werden. Die Struktur von HsFdx in Hochsalz unterscheidet sich folglich nicht wesentlich von der in 450 mM NaCl.



### 3.2.3 Struktur des HsFdx

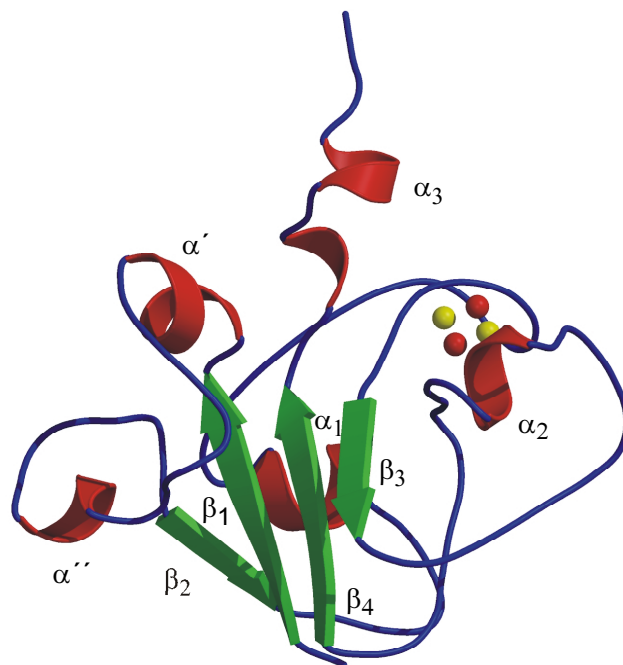
Eine Überlagerung der 20 energieärmsten Strukturen des HsFdx aus der Rechnung 1E10 ist in der Abbildung 21 gezeigt.

**Abbildung 21:** Überlagerung der 20 energieärmsten Strukturen des HsFdx ( $C_\alpha$ -Kette: gelb), die mit Hilfe der NMR-Daten berechnet wurden (1E10). Das Peptidrückgrat der daraus gemittelten Struktur ist in lila dargestellt.



Die Struktur des Ferredoxins aus *H. salinarum* ist aus einem gemischten viersträngigen  $\beta$ -Faltblatt, aufgebaut, welches von einer  $\alpha$ -Helix flankiert wird (Abbildung 22). Das viersträngige  $\beta$ -Faltblatt wird von den antiparallelen Strängen  $\beta_1$ (2-7) und  $\beta_2$ (37-41) gebildet, dem zu  $\beta_1$  parallelen Strang  $\beta_4$  (110-115) und dem zu Strang  $\beta_4$  antiparallelen Strang  $\beta_3$  (72-77). Das viersträngige  $\beta$ -Faltblatt wird von der Helix  $\alpha_1$  (47-53) flankiert. Die Helix  $\alpha_2$  (90-95) befindet sich in der Nähe des aktiven Zentrums. Die acide Domäne (7-36) nahe zum N-Terminus wird aus den Helices  $\alpha'$  (9-13) und  $\alpha''$  (23-28) gebildet, die durch einen Loop verbunden sind.

**Abbildung 22: Schematische Darstellung der gemittelten Struktur des HsFdx.**  $\beta$ -Faltblätter sind in grün,  $\alpha$ -Helices in rot dargestellt. Die Eisenatome des Eisen-Schefel-Clusters sind in rot abgebildet, die Schwefelatome in gelb.



Die beiden Helices  $\alpha'$  +  $\alpha''$  werden im Folgenden als Extra-Domäne bezeichnet. Die 13 sauren Reste in diesem Bereich befinden sich ausschließlich auf der Oberfläche des Proteins.

Die dominierenden hydrophoben Kontakte im Kernbereich des Proteins kommen von der Seite der  $\beta$ -Faltblätter hauptsächlich durch die Wechselwirkung von aromatischen Aminosäuren (Y5, Y57, W59, Y115) zustande. Bei den hydrophoben Aminosäuren der Helix handelt es sich vor allem um aliphatische Reste (Leucin, Isoleucin und Valin).

Die N-terminale Insertion (7-36) wechselwirkt über die Aminosäuren L11, L23, F24 und A27 mit L6 und Y37 des hydrophoben Kerns. Die Überlagerung von 116 äquivalenten Aminosäurepositionen der NMR-Struktur des HsFdx mit der Kristallstruktur von *Haloarcula marismortui* Ferredoxin (HmFdx) durch das Programm „ga\_fit“ ergab einen *rmsd* Wert der Rückgratatome von 1.22 Å. Die Orientierung des Carboxyterminus wurde bei dieser Überlagerung nicht berücksichtigt, da sie aufgrund fehlender NOE Resonanzen anhand der NMR-Daten nicht bestimmt werden konnte. In der Kristallstruktur des HmFdx liegt der Carboxyterminus nahe beim aktiven Zentrum, was dafür spricht, dass die NOE Signale aufgrund der Wechselwirkungen mit dem paramagnetischen Cluster nicht detektierbar sind (Abbildung 38).

Für das Tryptophan 16 konnten keine NOE-Signale detektiert werden und aus diesem Grund konnte seine Orientierung in Bezug auf benachbarte Aminosäuren nicht bestimmt werden. Diese Aminosäure bildet in der Kristallstruktur des HmFdx viele hydrophobe Wechselwirkungen aus, die für die Orientierung der sauren Domäne (7-36) zuständig sind. Für die B-Faktoren der Aminosäuren aus den beiden  $\alpha$ -Helices (9-13) und (23-28) wurden bei den ersten kristallographischen Messungen höhere Werte im Vergleich zum Rest beobachtet, so dass dynamische Effekte in Lösung für das Fehlen der Signale verantwortlich sein könnten (Eisenberg et al., 1992).

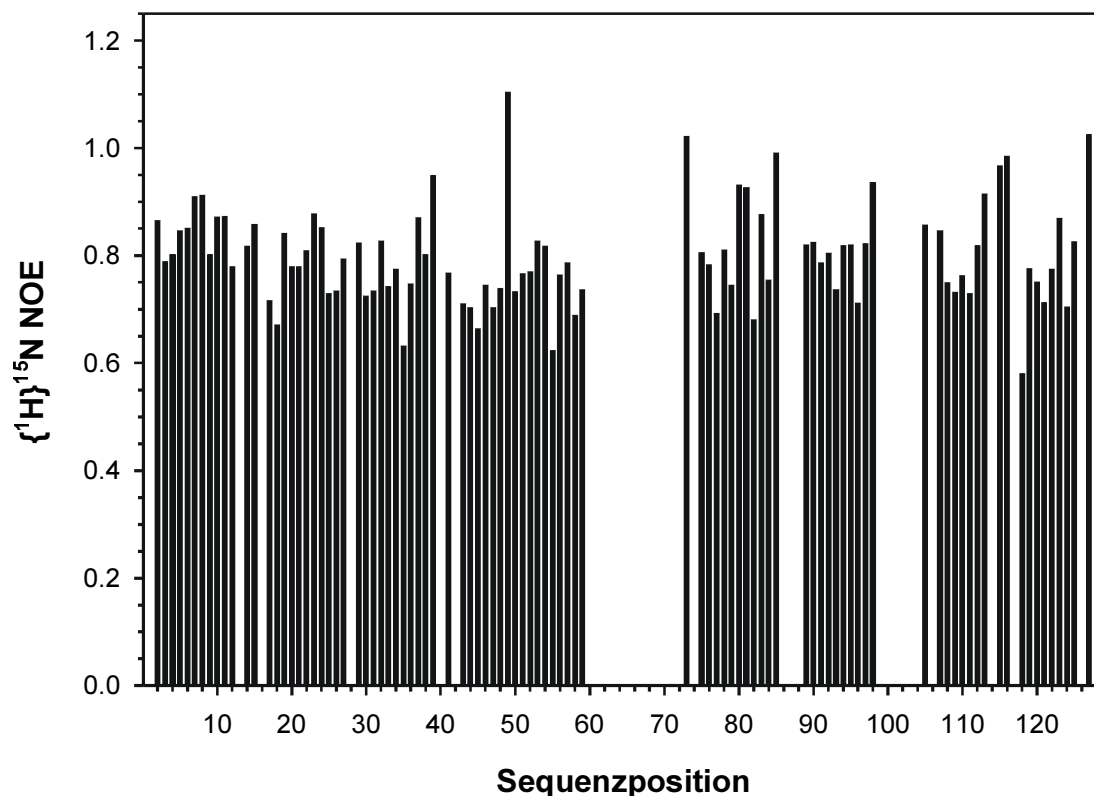
Um die Seitenkettendynamik des Proteins zu untersuchen, wurden Relaxationsstudien an dem  $^{15}\text{N}$ -markierten Protein durchgeführt.

### 3.2.4 Flexibilität der Aminosäurereste des HsFdx

Die Dynamik und damit die Flexibilität einzelner Aminosäurereste kann anhand der Analyse von  $^{15}\text{N}$ - $^1\text{H}$ -Spektren bestimmt werden. Für eine Standardanalyse werden die Relaxationszeiten der  $^{15}\text{N}$ -Kerne  $T_1$  (Spin-Gitter) und  $T_2$  (Spin-Spin) bestimmt. Um die Beweglichkeit des Aminosäurerückgrates zu studieren, sind besonders die  $\{^1\text{H}\}^{15}\text{N}$  NOEs nützlich (Kazanis & Pochapsky, 1997), (Farrow et al., 1997). Die  $\{^1\text{H}\}^{15}\text{N}$  NOEs stellen das Verhältnis der  $^{15}\text{N}$  Peakintensitäten bei Sättigung der Protonen und ohne diese zueinander dar. Solange Dipol-Dipol-Wechselwirkungen des Stickstoffs mit dem gebundenen Proton die Hauptursache für die Relaxation sind, stellt das NOE Verhältnis ein Maß für die Flexibilität der zugehörigen Aminosäuren dar. Allerdings können paramagnetische Effekte die Relaxationswerte ebenfalls beeinflussen.

Die NOE Werte variieren in der Regel zwischen -3.6 und 0.82 bei 600 MHz (Kay et al., 1989). Die Werte können, durch den Austausch von Amidprotonen mit Wasser verursacht, auch etwas höher liegen (Beeser et al., 1997).

**Abbildung 23:** Verhältnis  $\{^1\text{H}\}^{15}\text{N}$  NOE der  $^{15}\text{N}$  Peakintensitäten mit und ohne Sättigung der Amidprotonen. Aufgetragen gegen die Sequenzposition der zugehörigen Aminosäure.



Die einheitlichen NOE Werte nahe dem theoretischen Maximum legen nahe, dass die Flexibilitäten aller Aminosäuren ähnlich sind. Somit sind keine besonderen Bereiche im HsFdx auszumachen, in denen die Aminosäuren eine höhere Beweglichkeit zeigen. Starke Abweichungen der NOE Werte nach oben sind wahrscheinlich auf den Einfluß paramagnetischer Effekte auf die Relaxation zurückzuführen.

Um festzustellen, ob die Entfaltung des HsFdx mit der Denaturierung der Extra-Domäne beginnt, wurde die temperaturabhängige Entfaltung des Proteins NMR-spektroskopisch untersucht.

### 3.2.5 Temperaturabhängige Entfaltung des HsFdx

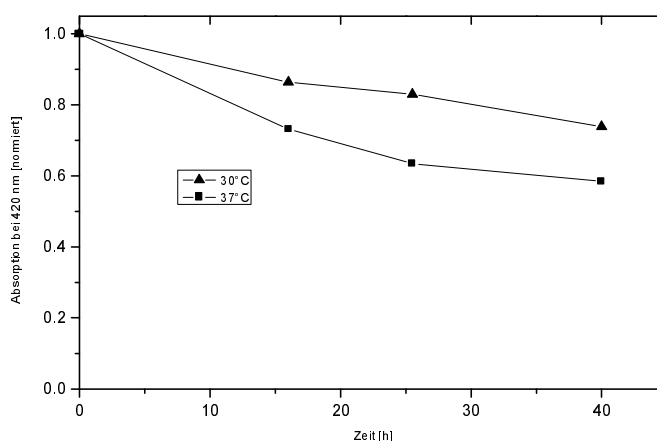
Gerade auf dem Gebiet der Faltungsstudien hat sich die NMR-Spektroskopie zu einer leistungsfähigen Methode entwickelt. Über die Änderung der Signalintensität mit der Zeit kann eine Veränderung der Umgebung jeder einzelnen Aminosäure detektiert werden. Während der Entfaltung eines Proteins kommen Reste in eine hydrophile Umgebung, die sich

ursprünglich im hydrophoben Kern befanden. Diese Konformationsänderung bringt es mit sich, dass sich die chemische Umgebung der Kerne verändert. Daraus resultiert eine Änderung ihrer chemischen Verschiebungen und der Kreuzkopplungen der Kerne untereinander. Aufgrund der guten Auflösung der Signale eignen sich gerade  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC Spektren dazu, den Zerfall einer Proteinstruktur zu studieren.

Bevor die NMR-Messungen durchgeführt werden konnten, mussten geeignete Bedingungen für Zersetzungsmessungen ermittelt werden. Die Entfaltung des Ferredoxins musste in einem durch NMR-Messungen beobachtbaren Zeitraum erfolgen. Für ein  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC Spektrum wurden die Signale über eine Stunde addiert. Damit die Mittelwertbildung über diesen Zeitraum aussagekräftig war und keine großen Abweichungen auftraten, mußte die Halbwertszeit der Denaturierung deutlich größer als eine Stunde sein. Deshalb wurden Stabilitätsmessungen bei unterschiedlichen Temperaturen durchgeführt, um die Temperatur zu bestimmen, bei der sich ein Großteil des HsFdx innerhalb von zwei bis drei Tagen entfaltete. Die Salzkonzentration der Lösung wurde auf 450 mM NaCl und der pH Wert auf 6.5 eingestellt, um unter den gleichen Pufferbedingungen zu arbeiten wie bei den Messungen für die Strukturanalyse.

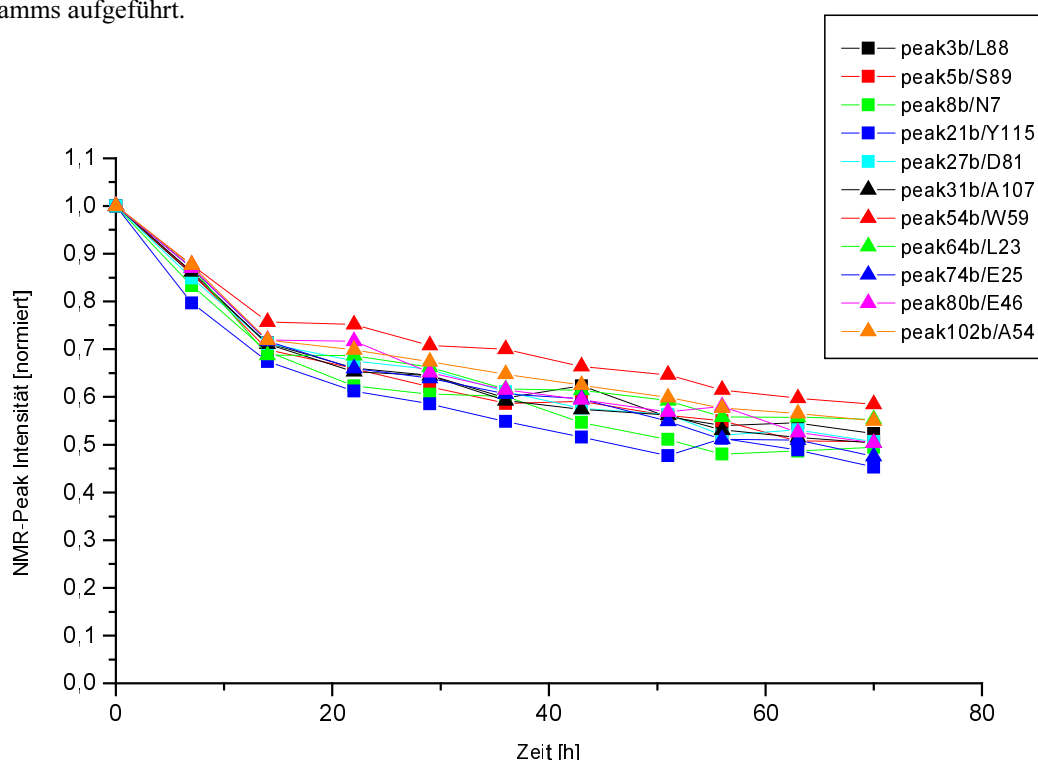
Es stellte sich heraus, dass eine Temperatur von 37-40 °C für Denaturierungsexperimente optimal ist, da die Absorptionsintensität bei 420 nm innerhalb von 40 h bei 37 °C um 40% zurückging, und somit deutliche Intensitätsänderungen der NMR-Signale zu erwarten waren (s. Abbildung 24). Bei höheren Temperaturen fand die Zersetzung zu schnell statt, um sie auf der NMR Zeitskala beobachten zu können ( $t_{1/2}(65\text{ °C}) = 10\text{ min}$ ,  $t_{1/2}(53\text{ °C}) = 1\text{ h}$ ).

**Abbildung 24: Zeitverlauf der Absorptionsänderung bei 420 nm des HsFdx in Abhängigkeit von der Temperatur.** Probe in 430 mM NaCl, 10 mM Natriumphosphatpuffer, pH 6.5, nach Inkubation bei 30 °C und bei 37 °C.



Um die Entfaltung von HsFdx zu verfolgen, wurden nacheinander 68  $^{15}\text{N}$ -HSQC Spektren aufgenommen, die jeweils die Mittelung über den Zeitraum von etwa einer Stunde darstellten. Von diesen wurden 11 Spektren für die weitere Analyse ausgewählt, zwischen deren Aufnahme jeweils ein Zeitraum von etwa sechs Stunden lag. Zwar unterscheiden sich die chemischen Verschiebungen der einzelnen Aminosäuren bei 40 °C von der bei 17 °C, aber die Signale besitzen dieselbe relative Position zueinander. Durch Vergleich eines Spektrums bei 40 °C mit einem bei 17 °C wurde die Zuordnung für ein Referenzspektrum durchgeführt. Anschließend wurden die restlichen Spektren gegen dieses abgeglichen. So konnten die Resonanzen des entfalteten Proteins aussortiert werden. Die Zuordnung einiger Signale ließ sich anhand des  $^{15}\text{N}$ -HSQC Spektrums nicht eindeutig treffen (Tabelle 6).

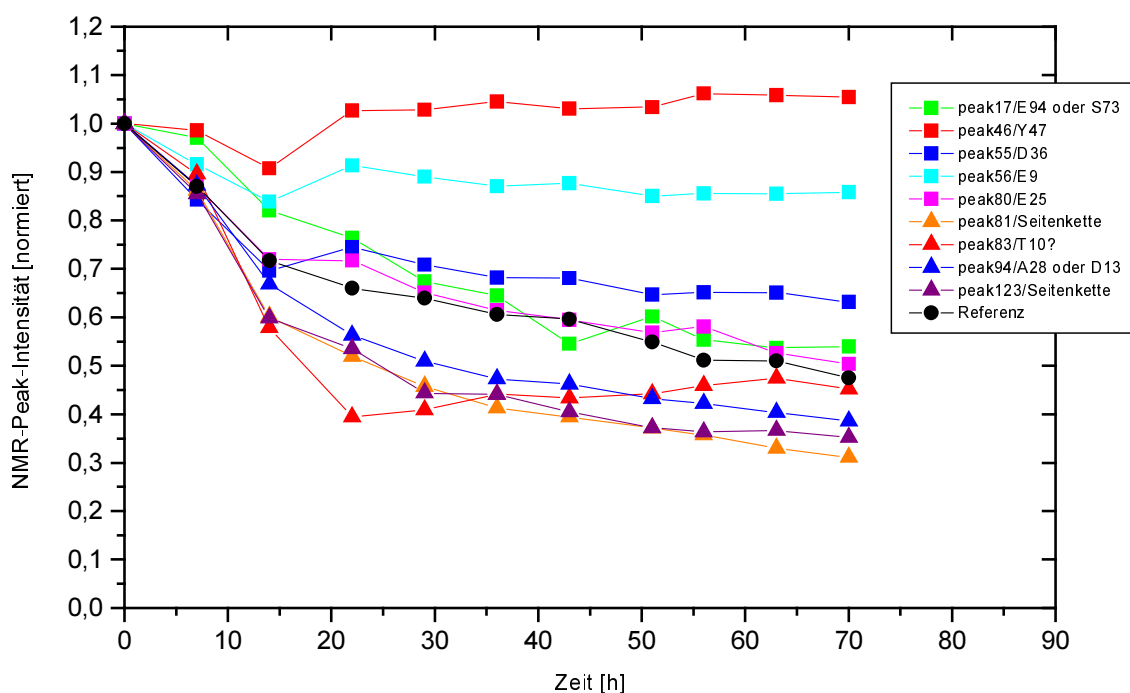
**Abbildung 25: NMR-Intensitätsverlauf einer repräsentativen Auswahl von NMR-Signalen.** Es ist eine Auswahl des Intensitätsverlaufs mit der Zeit von einzelnen Peaks des HsFdx dargestellt. Die Auswahl der Resonanzen erfolgte zufällig. Es wurden die Signale unterschiedlicher Aminosäuren ausgewählt, die sich in verschiedenen Bereichen des Proteins befinden. Die Zuordnung der Resonanzen ist in der Legende des Diagramms aufgeführt.



Die Intensitäten der zugeordneten Resonanzen wurde gegen die Zeit der Inkubation bei 40 °C aufgetragen. Eine repräsentative Auswahl der Signale von Kernen aus den verschiedenen Bereichen des HsFdx zeigt, dass der Zeitverlauf der meisten Signale ähnlich ist (Abbildung 25).

Nur für wenige Reste zeigt die Intensität der zugehörigen Amidprotonenresonanz einen anderen zeitlichen Verlauf als der Durchschnitt (Abbildung 26). Eine langsamere Abnahme der Signalintensität kann auch dadurch zustande kommen, dass das entfaltete Apoprotein zufällig dieselbe Amidprotonenresonanz zeigt, und ein geringerer Anteil an Holoprotein durch die Steigerung der Apoproteinkonzentration ausgeglichen wird. Eine schnellere Intensitätsabnahme hingegen bedeutet, dass sich die Umgebung des zugehörigen Restes früher ändert als die der anderen und die Struktur in diesem Bereich bei der Entfaltung des Proteins schneller aufbricht. Eine raschere Intensitätsabnahme wird nur für zwei Seitenkettenamide und die beiden Amide, die zu den Aminosäuren T10 und A28 oder D13 gehören, beobachtet.

**Abbildung 26:** Darstellung des zeitlichen Verlauf der Signalintensitäten der Amidprotonen des HsFdx bei der Inkubation bei 40 °C.



**Tabelle 6:** Zuordnung der NMR-Signale mit den zugehörigen Verschiebungen der Aminosäuren.

	$\delta(^{15}\text{N})$	$\delta(^1\text{H})$	Aminosäure
Peak 17	118.0	8.99	E 94 oder S 73
Peak 46	122.3	8.34	Y 47
Peak 55	120.2	8.05	D36
Peak 56	115.0	8.02	E9

Peak 80	123.1	7.60	E25
Peak 81	126.1	7.59	Seitenkette
Peak 83	113.6	7.54	T10 ?
Peak 94	119.5	7.24	A 28 oder D13
Peak 123	128.5	6.56	Seitenkette

Aufgrund des homogenen Zeitverlaufs fast aller beobachteten Signalintensitäten kann ausgeschlossen werden, dass die Denaturierung des HsFdx nicht mit dem Verlust der Helixstruktur von  $\alpha'$  und  $\alpha''$  beginnt, wenn die Messungen bei einer Salzkonzentration von 450 mM NaCl durchgeführt wurden. Der hohe Anteil an negativen Ladungen dieser beiden Helices bewirkt somit bei niedrigen Salzkonzentrationen keine Destabilisierung der Sekundärstruktur in diesem Bereich, die zu einer früheren Entfaltung führt.

Für die Aminosäuren in der Nähe des Eisen-Schwefel-Komplexes können keine Signale gemessen werden. Über den Zusammenhang der Denaturierung des HsFdx und die Komplexierung des Eisen-Schwefel-Komplexes konnte daher mit diesem Experiment keine Aussage gemacht werden.

### 3.3 Teil B: Herstellung von Mutanten des HsFdx und ihre Charakterisierung im Vergleich zu HsFdx

Die halophilen Ferredoxine unterscheiden sich von den Pflanzentypferredoxinen durch eine Insertion von 30 Aminosäuren nahe dem N-Terminus. Diese Insertion bildet eine kleine Extra-Domäne aus, die aus den zwei Helices  $\alpha'$  und  $\alpha''$  besteht. Sie zeichnet sich durch einen hohen Anteil an sauren Resten aus, 13 der 30 Aminosäure sind Aspartat oder Glutamat.

Bei HsFdx handelt es sich um ein halophiles Protein, das sich nur in Gegenwart von NaCl Konzentrationen größer 0.5 M in seine native Konformation faltet und dessen Stabilität mit steigender Salzkonzentration zunimmt. Um den Einfluß der aciden Domäne auf die Halophilie des Proteins zu untersuchen, wurden Mutanten hergestellt, bei denen dieser Bereich des HsFdx deletiert ist. Die ersten N-terminalen Aminosäuren bis etwa Rest 6-9 bilden in den halophilen Proteinen und den Pflanzentypferredoxinen das Faltblatt  $\beta_1$ , welches an der Ausbildung des hydrophoben Kerns beteiligt ist (s. Abbildung 27). Aus diesem Grund wurde die Extra-Domäne, bestehend aus den beiden Helices  $\alpha'$  (9-13) und  $\alpha''$  (23-28) nahe



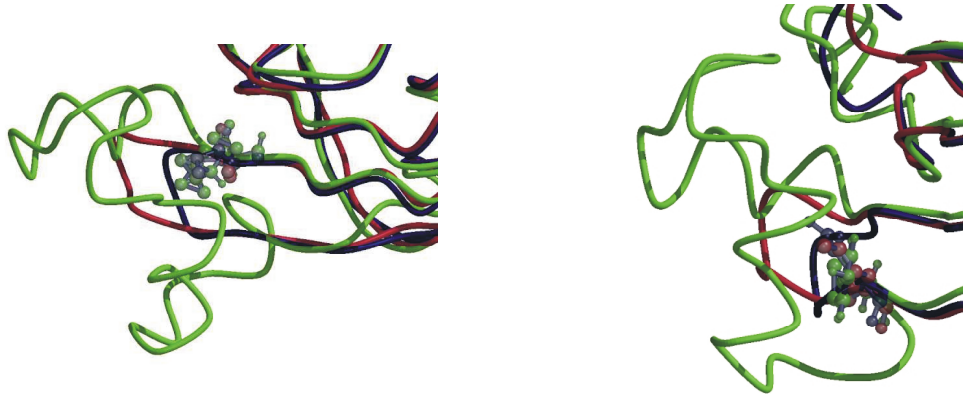
des N-Terminus, durch Oligonukleotid-gerichtete Mutagenese deletiert und durch den entsprechenden Loop aus *Anabaena* Ferredoxin (Name der Mutante: **Fdxana**) bzw. den Turn aus *Equisetum arvense* Ferredoxin (Name der Mutante: **Fdxequi**) ersetzt.

**Abbildung 27: Überlagerung der Strukturen von HsFdx (grün), *Anabaena* Ferredoxin (rot) und *Equisetum arvense* Ferredoxin (blau)** [(PDB-Datenbankeintrag 1EOZ) (Marg et al., 2001); (PDB-Datenbankeintrag 1FXA) (Rypniewski et al., 1991); (Datenbankeintrag 1FRR) (Ikemizu et al., 1994) respektive]. Die Pfeile zeigen auf die Bereiche, welche in der Abbildung 28 vergrößert dargestellt sind.



Eine Analyse der Überlagerung der drei Pflanzentypferredoxine HsFdx, *Anabaena* Ferredoxin und *Equisetum arvense* Ferredoxin zeigte, dass die Aminosäuren L6 von HsFdx, I8 von *Anabaena* Ferredoxin und K7 des *E. arvense* Ferredoxins als jeweils letzte Aminosäure des  $\beta_1$ -Strangs dieselbe Position einnehmen (Abbildung 28). Am Ende der sauren Domäne des HsFdx befindet sich ein Y37, während an dieser Position im *Anabaena* Ferredoxin ein K15 und im *E. arvense* Ferredoxin ein E12 stehen (Abbildung 28).

**Abbildung 28: Ausschnittsvergrößerung aus Abbildung 27.** In dem linken Teil der Abbildung sind die Seitenketten der Aminosäuren L6, I8 und K7 der verschiedenen Ferredoxine dargestellt, in der rechten Abbildung Y37, K15 und E12. HsFdx ist in rot dargestellt, das Ferredoxin aus *Arvense* in grün und des Ferredoxin aus *E. arvense* in blau.



Für das Design der Mutante Fdxana wurde anstelle der Reste 7-36 des HsFdx der Loop insertiert, welcher im Anabaena Ferredoxin von den Resten 9-14 gebildet wird (NEAEGT). In der Mutante Fdxequi sind ebenfalls die Reste 7-36 deletiert und durch den Turn 8-11 aus *E. arvense* (TPSG) ersetzt. Mit Hilfe dieser Mutanten sollte der Einfluß der Deletion der Extra-Domäne auf die Stabilität des Proteins in Abhängigkeit von der Salzkonzentration untersucht werden.

### 3.3.1 Klonierung der Mutanten

Zuerst wurden die jeweiligen Expressionsplasmide für eine rekombinante Expression des HsFdx erstellt. Das für HsFdx kodierende Genfragment wurde aus dem Cosmid RI45 amplifiziert. Ausgehend davon konnten durch Oligonukleotid-gerichtete Mutagenese Genfragmente mit den erwünschten Deletionen hergestellt werden.

HsFdx	1-L(6)- [ 7-36 ]-Y(37)-128
	↓
<i>Anabaena</i> Fdx	1- 8 -NEAEGT- 15-97
	⇒ <b>Fdxana</b>

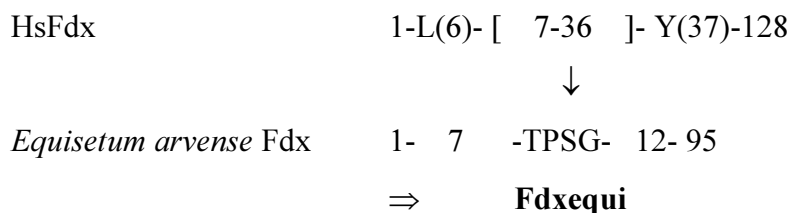


Tabelle 7: Tabellarische Auflistung der erzeugten Expressionsvektoren.

Expressionsplasmid	Vektor	Organismus	Bemerkung
pBPH-M-FdxWt -Fdxana -Fdxequi	pBPH-M	<i>H. salinarum</i>	C-terminale (His) <sub>6</sub> -Fusion mit Thrombinschnittstelle
pHus-FdxWt -Fdxana -Fdxequi	pHus-Brfus	<i>H. salinarum</i>	N-terminale Fusion mit Bacteriorhodopsin (BR) mit Faktor Xa Schnittstelle
pEt36b-FdxWt -Fdxana -Fdxequi	pET36b	<i>E. coli</i>	
pGEX- FdxWt -Fdxana -Fdxequi	pGEX-4T.1	<i>E. coli</i>	C-terminale Fusion mit Glutathion-S-transferase (GST) mit Thrombinschnittstelle

### 3.3.1.1 Klonierung von pBPH-M-FdxWT, pBPH-M-Fdxana und pBPH-M-Fdxequi

HsFdx fungiert als Elektronenakzeptor bei der Oxidation von Pyruvat zu AcetylCoA, und ist somit an einer essentiellen Stoffwechselreaktion beteiligt. Deshalb ist seine Deletion letal für *H. salinarum* (Van der Plas et al., 1988). Eine homologe Expression der Ferredoxinmutanten ist also nur in Gegenwart des Wildtypferredoxins möglich. Deshalb wurden die rekombinanten Proteine mit einem Affinitätsanhang versehen, sechs Histidinen, die eine Abtrennung des rekombinanten HsFdx vom HsFdx ohne Histidinanhang über eine Nickelsäule ermöglichen.

Die Abtrennung des (His)<sub>6</sub> Anhangs erfolgt über eine Thrombinschnittstelle.

### **3.3.1.2 Klonierung von pHus-FdxWT, pHus-Fdxana und pHus-Fdxequi**

Der Vektor pHus-BrFus enthält die Bacteriorhodopsinsequenz unter der Kontrolle des Bacteriorhodopsinpromotors. Eine Multiple-Cloning-Site am 3'-Ende von BR ermöglicht die Herstellung von Fusionsproteinen, die über ihren N-Terminus an BR gebunden sind. Die Trennung des rekombinant hergestellten Proteins vom BR wird über Schneiden mit Faktor Xa erreicht.

Das Bacteriorhodopsin wird von Halobakterien in großen Mengen produziert und in die Membran eingebaut. Die Isolierung des Fusionsproteins sollte somit schnell und effizient über die BR spezifische Aufreinigung erfolgen können.

### **3.3.1.3 Klonierung von pEt36b-FdxWt, pEt36b-Fdxana und pEt36b-Fdxequi und Klonierung von pGEX-FdxWt, pGEX-Fdxana und pGEX-Fdxequi**

Da die Mutanten Fdxana und Fdxequi eher den Pflanzentyp- als den halophilen Ferredoxinen gleichen, sollte neben den Halobakterien *E. coli* als mesophiler Wirt eingesetzt werden. Sowohl der Vektor pET36b (Novagen) als auch der Vektor pGEX (Invitrogen) sind für die Expression von Proteinen in *E. coli* konzipiert.

Die Fusion von Proteinen mit Glutathion-S-Transferase (GST), die auf dem pGEX Vektor kodiert ist, wird für die Aufreinigung über eine Affinitätssäule (Glutathion-Sepharose) genutzt.

### **3.3.2 Expression von rekombinant erzeugtem HsFdx und den Mutanten Fdxana und Fdxequi**

Für die homologe Expression wurde der Stamm Snob von *H. salinarum* gewählt, dessen Bacteriorhodopsin- und Halorhodopsin-Gene deletiert sind.

Für die heterologe Expression in *E. coli* wurde der Stamm BL21(DE3)RIL verwendet, da er zusätzliche Plasmide enthält, auf denen t-RNAs für seltene Kodons kodiert sind.

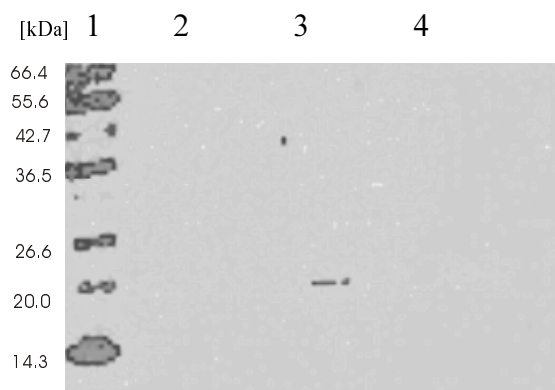
#### **3.3.2.1 Homologe Expression in *H. salinarum*, (His)<sub>6</sub>-Fdx**

Die homologe Rekombination der Expressionsvektoren in das Genom wurde durch PCR von der genomischen DNA und durch Sequenzierung überprüft. Es wurde eine Expressionsanalyse mit täglicher Probennahme durchgeführt. (His)<sub>6</sub>-WtFdx wurde auf einem Western Blot mit Anti-His-Antikörper als schwache Bande auf der Höhe von 20 kDa detektiert.

Halophile Proteine, an die sechs Histidine gekoppelt sind, besitzen ein geringeres apparentes Molekulargewicht im SDS-Gel als ihre native Form.

**Abbildung 28: Expressionsnachweis des (His)<sub>6</sub>WtFdx durch Western Blot mit einem Anti-His Antikörper.**

1: Marker; 2: nach 1 Tag; 3: nach 2 Tagen; 4: nach 3 Tagen Wachstum der Zellen.



Das Expressionsprodukt für (His)<sub>6</sub>-WtFdx wurde nur nach zwei Tagen Wachstum der Zellen im Westernblot detektiert. Dies ist in Übereinstimmung mit der Beobachtung, dass auch bei anderen halophilen Proteinen, die homolog in *H. salinarum* exprimiert wurden, die Histidinreste nach Beginn der Expression „*in-vivo*“ abgeschnitten werden.

Die Analyse der Expression von den Mutanten (His)<sub>6</sub>-Fdxana und (His)<sub>6</sub>-Fdxequi mit einem Westernblot ergab, dass die beiden Proteine in *H. salinarum* nicht exprimiert wurden.

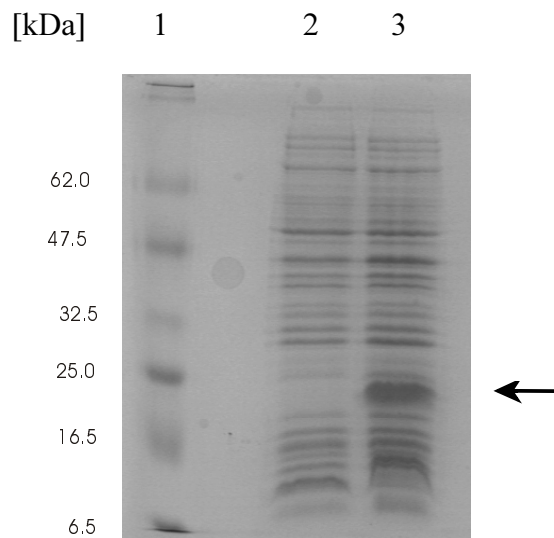
### 3.3.2.2 Homologe Expression des rekombinanten FdxWt, Fdxana und Fdxequi in *H. salinarum*, BR-Fusionsprotein

Die Expression von BR-FdxWt, BR-Fdxana und BR-Fdxequi im *H. salinarum* Stamm Snob ist anhand der charakteristischen violetten Färbung der Kolonien zu erkennen, wenn das BR-Fusionsprotein exprimiert wird. Dies war nur im Fall des WtFdx Konstruktes der Fall.

### 3.3.2.3 Heterologe Expression von WtFdx, Fdxana und Fdxequi in *E. coli*

Nur für Fdxana konnte eine Überexpression beobachtet werden. Die Expression bei 25 °C war 3 h nach Induktion mit 1 mM IPTG maximal. Nach Beginn der Expression wurde eine deutliche Verringerung des Zellwachstums bemerkt. Die Bande des Fdxana läuft in einem 15% SDS Gel auf einer Höhe von etwa 20-22 kDa.

**Abbildung 29: 15% SDS-PAGE von BL21(DE3)RIL-Fdxana vor und nach der Expression.** 1: MW, 2: Vor der Induktion, 3: 3 h nach der Induktion von BL21(DE3)RIL mit pET36b-Fdxana

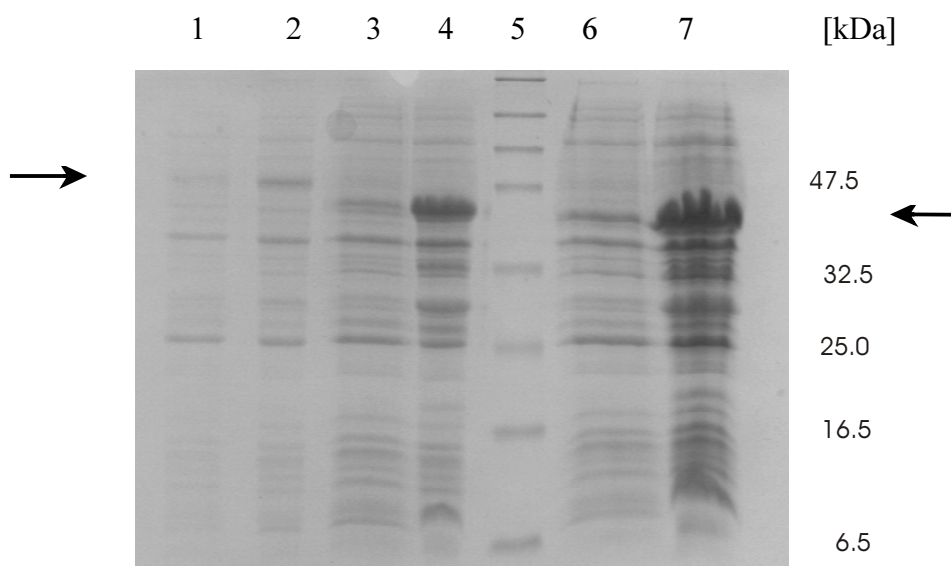


Somit konnte in dem mesophilen Organismus *E. coli* eine Überexpression der Deletionsmutante Fdxana erreicht werden.

#### 3.3.2.4 Heterologe Expression von GST-WtFdx, GST-Fdxana und GST-Fdxequi in *E. coli*

Es wurde eine Überexpression für alle drei GST-Fusionsproteine bei 25 °C beobachtet. Die Bande des GST-FdxWt ist im SDS Gel auf einer Höhe von etwa 48 kDa zu sehen, die Banden des GST-Fdxana bzw. GST-Fdxequi sind bei ca. 40 kDa zu finden. Die Glutathion-S-Transferase besitzt ein Molekulargewicht von 26 kDa. Somit liegt das apparente Molekulargewicht der Fusionsproteine, welches für GST-FdxWt etwa 40 kDa und für GST-Fdxana und GST-Fdxequi etwa 37 kDa betragen sollte, bei einem etwas höheren Wert.

**Abbildung 30: Expressionscheck für die GST-Fusionsproteine.** 1: GST-FdxWt vor der Induktion, 2: 3 h nach der Induktion 3, GST-Fdxana vor der Induktion, 4: 4 h nach der Induktion, 5: MW, 6: GST-Fdxequi vor der Induktion, 7: 4 h nach der Induktion.



Da die Induktion der Expression von GST-FdxWt eine deutliche Verringerung des Zellwachstums mit sich brachte, wurden die Zellen in diesem Fall nicht wie bei GST-Fdxana und GST-Fdxequi nach drei, sondern erst nach vier Stunden Wachstum geerntet.

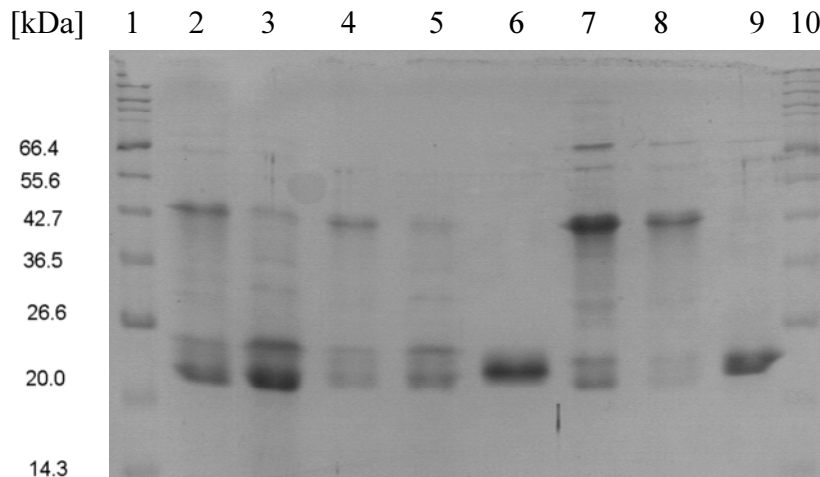
### 3.3.3 Rekonstitution und Aufreinigung der rekombinant erzeugten Proteine

#### 3.3.3.1 Homologe Expression

Die homologe Expression einer Mutante des HsFdx war in *H. salinarum* nicht möglich. Die Isolierung des rekombinanten WtFdx war nicht erforderlich, da auch ohne Überexpression ausreichende Mengen aus *H. salinarum* aufgereinigt werden konnten.

Für das BR-Fusionsproteins wurde deshalb nur geprüft, ob es durch BR-spezifische Isolierung über einen Zuckergradienten aufgereinigt werden konnte. Anhand des SDS-Gels wurde abgeschätzt, dass das Fusionsprotein mit Hilfe dieser Aufreinigung zu 90% rein erhalten wurde. Es konnte anschließend erfolgreich mit Faktor Xa gespalten werden.

**Abbildung 31: 15% SDS Gel der FaktorXa-Spaltung des BR-FdxWt Fusionsproteins.** 1: MW, 2: BR-FdxWt (Probe 1) nach FaktorXa-Spaltung (Konzentration 1/50), 3: BR-FdxWt (Probe1) nach FaktorXa-Spaltung (Konzentration 1/10), 4: BR-FdxWt (Probe 2) nach FaktorXa-Spaltung (Konzentration 1/50), 5: BR-FdxWt (Probe2) nach FaktorXa-Spaltung (Konzentration 1/10), 6: BR Referenz, 7: Probe 1, 8: Probe 2, 9: HsFdx Referenz, 10: MW.

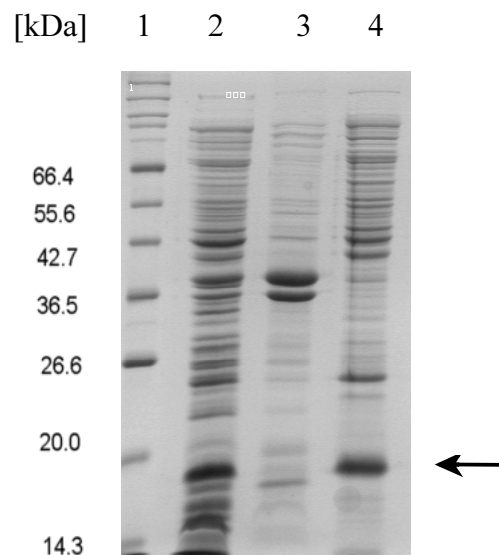


Die Fusion von halophilen Proteinen mit BR stellt somit eine einfache und effektive Möglichkeit für ihre homologe Überexpression in *H. salinarum* und ihre standardisierte Aufreinigung nach dem Protokoll für BR dar.

### 3.3.3.2 Heterologe Expression von Fdxana

Fdxana wurde bei 25 °C von *E. coli* Zellen Stamm BL21(DE3)RIL, die das Plasmid pET36b-Fdxana enthielten, exprimiert. Bei einer OD von 0.5-0.8 wurde mit 1 mM IPTG induziert und nach 3 h Expression wurden maximale Ausbeuten von Fdxana im Überstand erhalten.

**Abbildung 32: 15% SDS Gel von der Aufreinigung des Fdxana.** 1: MW, 2: Gesamtzellextrakt, 3: Pellet nach Zentrifugation, 4: Überstand des Zellextraktes nach Rekonstitution und Aufreinigung über eine DEAE-Säule.





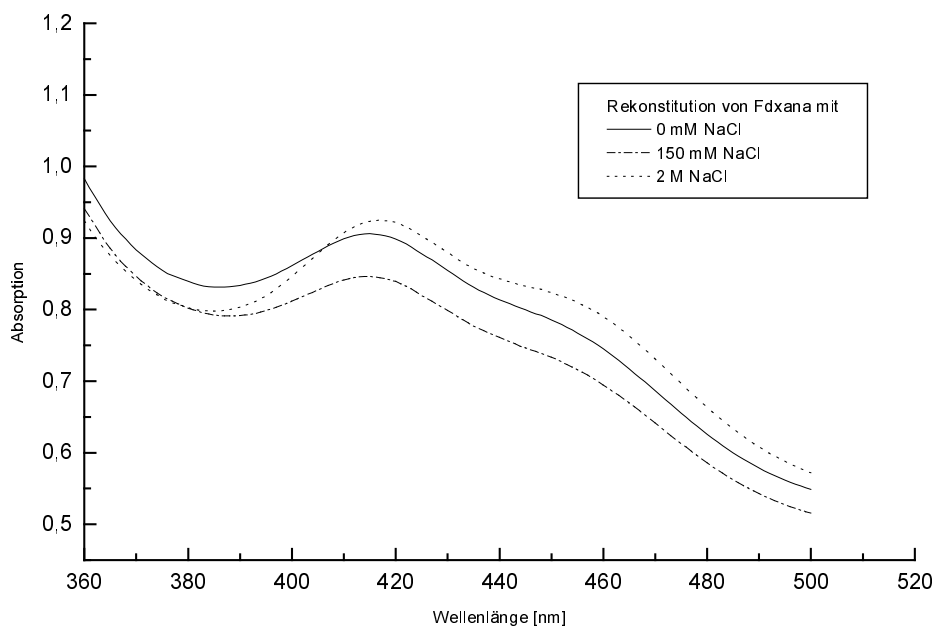
Konzentrieren des Zellüberstandes auf DEAE-Cellulose und anschließende Elution lieferten kein Eluat mit der für Ferredoxine charakteristischen Absorption im sichtbaren Bereich. In einem SDS freien Acrylamidgel des Cytosols konnte keine rote Bande an der Laufrfront identifiziert werden. Fdxana wurde also als Apoprotein exprimiert. Dieses Verhalten ist ebenfalls für andere rekombinant in *E. coli* produzierte Ferredoxine beobachtet worden (Cheng et al., 1995), (Xia et al., 1996). Zugabe von  $\text{FeSO}_4$  zum Medium und eine Erniedrigung der Expressionstemperatur auf 15 °C bewirkten ebenfalls keinen „*in-vivo*“ Einbau des Eisen-Schwefel-Clusters in Fdxana.

Daher war eine „*in-vitro*“ Rekonstitution des Fdxana notwendig. Der lösliche Cytosolanteil wurde nach dem Rekonstitutionsprotokoll für HsFdx rekonstituiert. Nach Zugabe von Eisensulfat und Dinatriumsulfid färbte sich die Lösung innerhalb einiger Minuten braunschwarz. Die anschließende Dialyse dieser Lösungen analog zum Rekonstitutionsprotokoll von HsFdx resultierte in farblosen Dialysaten. In einem weiteren Versuch wurde deshalb die Lösung nach der Rekonstitution durch Verdünnen anstelle der Dialyse in Trispuffer reproduzierbar umgepuffert. Dabei wurde der Einfluß der NaCl Konzentration durch Verdünnen mit Puffern unterschiedlicher NaCl Konzentration untersucht. Zwar lag das Ausmaß des Clustereinbaus in Gegenwart von 2 M NaCl nur bei etwa 20% im Vergleich zur Rekonstitution des Fdxana unter Niedrigsalzbedingungen, doch die Absorptionsmaxima des in Gegenwart von 0 mM, 150 mM oder 2 M NaCl rekonstituierten Fdxana waren identisch. Somit konnte gezeigt werden, dass die Deletion der aciden Extra-Domäne des HsFdx dazu führt, dass der Einbau des Eisen-Schwefel-Clusters unter Niedrigsalzbedingungen möglich ist, während die Rekonstitution des HsFdx nur unter Hochsalzbedingungen erfolgreich war.

Das rekonstituierte Fdxana wurde im Batch-Verfahren auf DEAE-Cellulose aufkonzentriert. Nachdem mit Niedrigsalzpuffer gewaschen wurde, wurde bei der Elution mit 1 M NaCl eine braunrote Fraktion erhalten. Kontrollexpressionen und anschließende Rekonstitution mit Zellysate von *E. coli* Zellen, die den Vektor ohne Insert oder den Vektor mit WtFdx enthielten, zeigten diese charakteristische Färbung nicht. Die rotbraune Färbung ist also eindeutig auf rekonstituiertes Fdxana zurückzuführen.

Die UV-VIS-spektroskopische Untersuchung der Fraktionen, die Fdxana enthielten, zeigten charakteristische Absorptionsmaxima im sichtbaren Bereich bei 417 nm und bei 455 nm. Die Absorptionsmaxima im UV konnten nach dieser Reinigungsstufe noch nicht bestimmt werden.

**Abbildung 33: Absorptionsspektren von Fdxana nach Rekonstitution aus dem Cytosol.** Einfluß der NaCl Konzentration auf die Rekonstitution des Fdxana, Absorptionsspektren der DEAE Eluate.



Erste Versuche, das Fdxana analog zu HsFdx durch Ammoniumsulfatfällung aufzureinigen, zeigten, dass das Protein schon bei einer Konzentration von 30% w/v  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ausfällt. HsFdx hingegen ist bis zu einer Ammoniumsulfatkonzentration von etwa 70% w/v löslich, wie es für Plazentyp-Ferredoxine typisch ist. Es wurde für Fdxana eine andere Aufreinigungsstrategie etabliert, die sich an die Isolierung des rekombinant in *E. coli* exprimierten *Anabaena* Ferredoxins anlehnt (Jacobson et al., 1992).

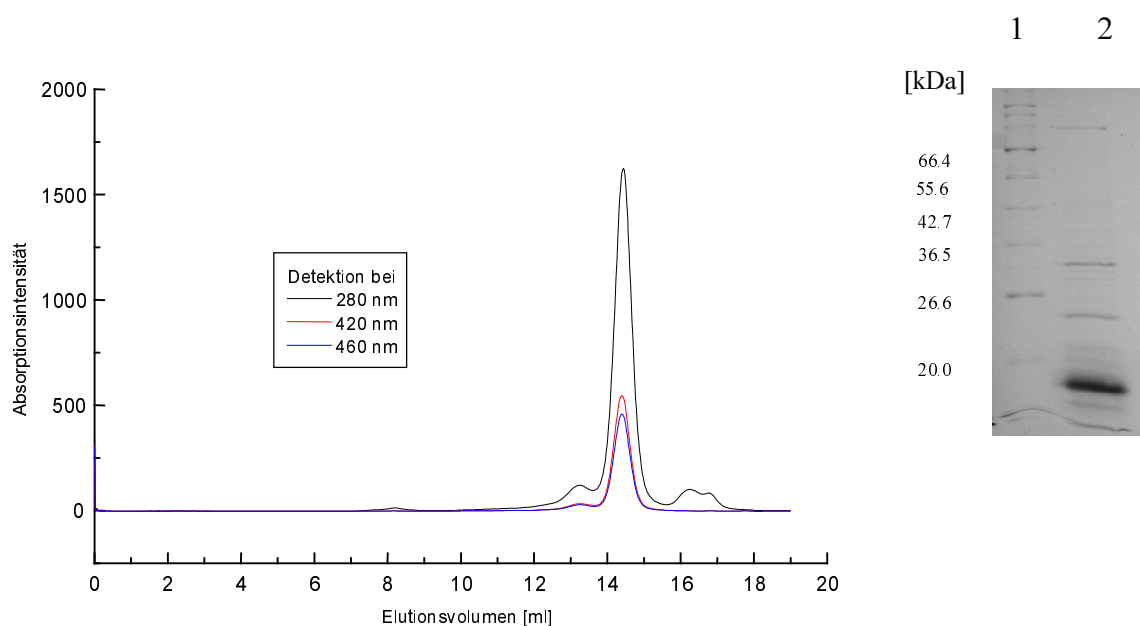
Das DEAE-Eluat wurde über eine Q-Sepharose-Säule, die mit einem linearen NaCl Gradienten entwickelt wurde, weiter aufgereinigt. Bei einer NaCl Konzentration von 0.35 M wurden Fraktionen erhalten, die in einem 15%igen SDS Gel eine dominierende Bande auf der Höhe von 20 kDa des Fdxana zeigten. Bei der massenspektrometrischen Untersuchung (MALDI-TOF) der entsprechenden Bande des SDS Gels nach Trypsin-Verdau wurden Fragmente des HsFdx gefunden. Nur für den N-terminalen Teil des HsFdx, der beim Fdxana deletiert ist, wurden keine Spaltungsprodukte identifiziert.

Als weiterer Aufreinigungsschritt wurde eine hydrophobe Hydroxyapatit-Säule mit einem Phosphat-Stufengradienten angeschlossen. Die Fdxana-Fraktionen wiesen nach dieser Aufreinigung nur noch wenige Banden anderer Proteine im SDS Gel auf. Allerdings nahm der Absorptionskoeffizient  $A_{417\text{nm}}/A_{275\text{nm}}$  mit diesem Schritt stark ab. Ein letzter Reinigungsschritt über eine Superose12-Gelfiltrationssäule lieferte Fdxana mit einer Reinheit größer 90% nach Abschätzung der SDS-Banden (s. Abbildung 34). Mit dieser Aufreinigung des Fdxana aus

*E. coli* konnte etwa 1 mg Protein pro Liter Kultur gewonnen werden, dessen Absorptionsverhältnis  $A_{417\text{nm}}/A_{275\text{nm}}$  maximal 0.3 erreichte.

Fdxana besitzt ein Tryptophan weniger als HsFdx. Die Absorption von Proteinen bei etwa 280 nm wird von den aromatischen Resten Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin verursacht (Lottspeich & Zorbas, 1998), wobei Tryptophan den größten Absorptionskoeffizienten besitzt. Vergleicht man den Anteil der aromatischen Aminosäuren in HsFdx und Fdxana und bezieht dabei die unterschiedlichen Absorptionskoeffizienten der drei aromatischen Reste mit ein, so erhält man für Fdxana als Holoprotein ein Absorptionsverhältnis zwischen 0.5 und 0.6. Das Absorptionsverhältnis von *Anabaena* Ferredoxin oder *Equisetum arvense* Ferredoxin, die keine Tryptophanreste enthalten, liegt bei 0.8 (Böhme & Schrautemeier, 1987; Hase et al., 1977a).

**Abbildung 34: Aufreinigung von Fdxana: Chromatogramm und SDS-PAGE.** Links: Chromatogramm der Aufreinigung von Fdxana über eine Superose12-Gelfiltrationssäule. Das HsFdx eluiert bei einem Elutionsvolumen von 14 ml. Rechts: 15% SDS-PAGE 1: Molekulargewichtsmarker; 2: Fdxana, Fraktion 14 (Elutionsvolumen).



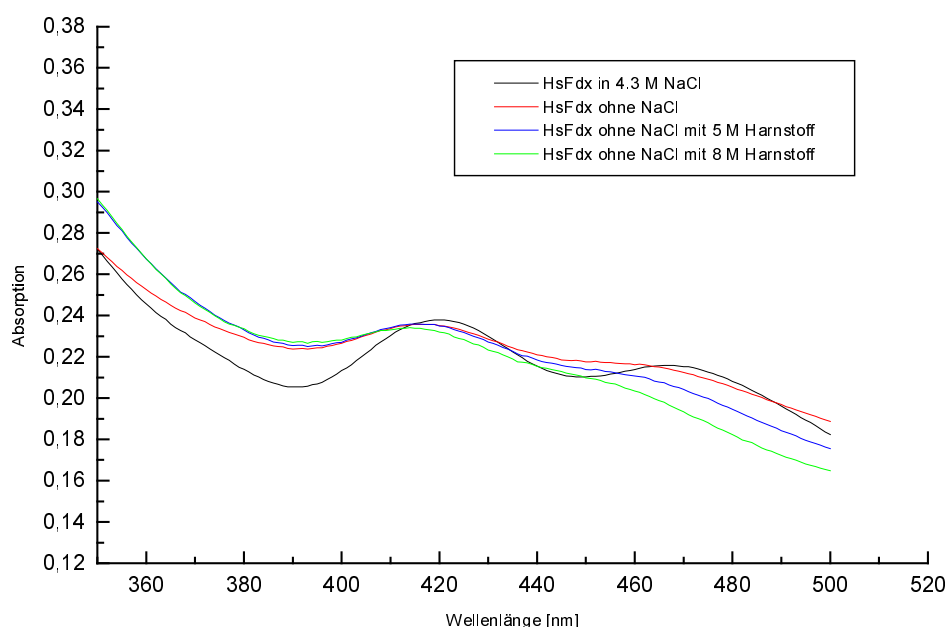
Die Analyse der CD-Spektren des Fdxana ergab, dass das Protein keine definierte Sekundärstruktur besitzt. HsFdx zeigt bei einem Absorptionsverhältnis  $A_{420\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$  von 0.2 im Vergleich zu 0.33 für das reine Holo-Protein ebenfalls einen deutlich verringerten Anteil an  $\beta$ -Faltblatt-Struktur und  $\alpha$ -Helices. Bei einem Absorptionsverhältnis von 0.3 ist möglicher-

weise der Anteil des Holo-Fdxana zu gering, um in den CD-Spektren den Sekundärstrukturanteil zu bestimmen.

Die Absorptionsmaxima des Fdxana sind mit 417 nm und 455 nm charakteristisch für ein Pflanzentypferredoxin in Gegenwart eines denaturierenden Agens wie z. B. 5 M Harnstoff (Petering & Palmer, 1970). Native 2Fe-2S-Ferredoxine besitzen typische Absorptionsmaxima bei 420 nm und 467 nm. Also handelt es sich bei Fdxana um ein teilweise denaturiertes 2Fe-2S Ferredoxin.

Dieselbe Verschiebung zu niedrigeren Wellenlängen der Absorptionsmaxima zeigte HsFdx unter denaturierenden Bedingungen in 8 M Harnstoff, allerdings nur unter Niedrigsalzbedingungen. In 4.3 M NaCl konnte selbst mit 8 M Harnstoff keine Änderung des Absorptionsverhaltens von HsFdx beobachtet werden. Dieses Ergebnis ist ein weiterer Hinweis dafür, dass HsFdx unter Hochsalzbedingungen ausgesprochen stabil ist.

**Abbildung 35: Absorptionsspektren von HsFdx in Abhängigkeit von der NaCl Konzentration und von der Harnstoffkonzentration.**



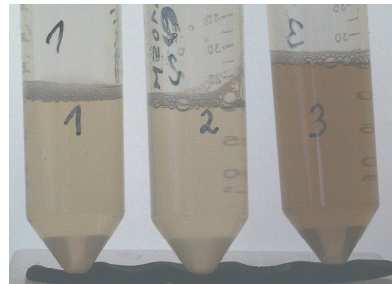
Die Absorptionsmaxima des HsFdx unter denaturierenden Bedingungen vor Verlust des Eisen-Schwefel-Clusters sind vergleichbar zu denen des Fdxana (siehe Abb. 14).

Eine Rekonstitution des aufgereinigten Fdxana war nicht erfolgreich. Um festzustellen, ob während der Aufreinigung ein für den Clustereinbau essentieller Kofaktor abgetrennt wird, wurde die Rekonstitution des aufgereinigten Fdxana zusammen mit *E. coli* Lysat durchgeführt.

Als Negativkontrolle wurde die Rekonstitution allein mit dem *E. coli* Lysat durchgeführt, und als Positivkontrolle diente die Rekonstitution des Zellysats der Fdxana exprimierenden Zellen. Die Zugabe von *E. coli* Cytosol zum aufgereinigten Fdxana bewirkte nicht den Einbau des Eisen-Schwefel Komplexes in das denaturierte Protein. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung ist, dass die Denaturierung des rekonstituierten Fdxana im Verlauf der Aufreinigung zu einer Konformation des Proteins führt, die auch durch Zugabe von Harnstoff nicht mehr in einen Zustand gebracht werden kann, in welchem eine Rekonstitution möglich ist.

**Abbildung 36: Rekonstitutionsversuche mit Fdxana auf unterschiedlichen Reinigungsstufen.**

1: Aufgereinigtes Fdxana mit Zellysats von pET36b/ BL21(DE3)RIL; 2: Zellysats von pET36b/ BL21(DE3)RIL; 3: Zellysats von pET36b-Fdxana/ BL21(DE3)RIL



Die Expression des Fdxana lieferte somit ein Apoferredoxin, dessen Eisen-Schwefel-Cluster unter Niedersalzbbedingungen im Cytosol rekonstituiert werden konnte. Allerdings bewirkte der Einbau des aktiven Zentrums nicht die korrekte Faltung des Proteins, so wie es beim HsFdx und anderen Pflanzentypferredoxinen der Fall ist.

Es besteht die Möglichkeit, dass die Deletion der Extra-Domäne zu einer Destabilisierung des  $\beta$ -Faltblatts führte. Obwohl eine Ausbildung der korrekten Faltung nicht möglich war und sich die Extra-Domäne und der Eisen-Schwefel-Cluster im Protein an gegenüberliegenden Seiten befinden, führte die Deletion der aciden Insertion dazu, dass der Einbau des Eisen-Schwefel-Clusters in Abwesenheit von Salz erfolgen kann.

### 3.3.4 Stabilität von Fdxana in Abhängigkeit von der Salzkonzentration

Die Stabilität von Fdxana im Cytosol und während der chromatographischen Aufreinigung wurde anhand der Änderung der Absorption bei 417 nm bestimmt.

Zuerst wurden die Stabilitäten des Apo- und des Holo-Fdxana im Cytosol verglichen. Zu diesem Zweck wurde nur die Hälfte des Zellextraktes zur Rekonstitution eingesetzt, und die andere Hälfte erst nach anderthalb Tagen rekonstituiert. Beide Proben wurden bei 4 °C gelagert. Die Absorptionsintensität bei 417 nm der beiden Proben ist vergleichbar. Das deutet darauf hin, dass Holo- und Apoprotein des Fdxana im Cytosol ähnlich stabil sind.

Die Lagerung von Fdxana bei 4 °C in Lösungen unterschiedlicher Salzkonzentration zeigte, dass in einem Puffer mit 150 mM NaCl die Absorptionsintensität bei 417 nm nach zwei Tagen noch 85% der anfänglichen Intensität beträgt, während sie in einer Lösung mit 1 M NaCl schon auf 65% abgesunken ist (Tabelle 8).

**Tabelle 8: Änderung der Absorption der cytosolischen Fraktion nach der Rekonstitution in Abhängigkeit von der Salzkonzentration der Lösung.**

	1. Tag	2. Tag
A <sub>417nm</sub> (150 mM NaCl)	97 %	85 %
A <sub>417nm</sub> (1 M NaCl)	83 %	65 %

Fdxana zeigte also im Gegensatz zu HsFdx keine Stabilisierung mit zunehmender Salzkonzentration, sondern ist sogar im Gegensatz dazu unter Niedrigsalzbedingungen stabiler. Die Deletion der aciden Extra-Domäne bewirkt, dass das Ferredoxin nicht mehr die typisch halophilen Eigenschaften zeigt.

### 3.4 DNA- und Aminosäuresequenz des Ferredoxins aus *H. volcanii*

Bei *H. volcanii* handelt es sich um einen moderat halophilen Organismus, dessen optimale Wachstumsbedingungen bei niedrigeren Salzkonzentrationen liegen, als die des halophilen Organismus *H. salinarum*. Es sollte festgestellt werden, ob das Ferredoxin aus *H. volcanii* sich durch eine andere Aminosäuresequenz und damit vielleicht durch andere strukturelle Merkmale auszeichnet als HsFdx.

Für die Isolierung von Ferredoxin aus *H. volcanii* (HvFdx) wurde das Aufreinigungsprotokoll für HsFdx und HmFdx angewendet. Das HvFdx besitzt wie das HsFdx Absorptionsmaxima bei 280 nm, 330 nm, 420 nm und 467. Ebenso zeigt das Ferredoxin aus *H. volcanii* auch ein ähnliches Laufverhalten im SDS-Gel. Allerdings waren trotz des Absorptionsverhältnisses von  $A_{420nm}/A_{280nm} = 0.3$  noch einige andere Banden im Gel sichtbar, wohingegen HsFdx bei

diesem Absorptionsverhältnis nur noch eine homogene Bande im SDS-Gel zeigt. Die N-terminale Sequenzierung lieferte folgende Aminosäuresequenz:

PTVTYLNIEVLDDNGW(E)LDD(oder E)DDL(oder G)FEQAA

Nach einem Verdau des HvFdx konnten diese drei Proteinfragmente sequenziert werden:

- 1: EGEIDMDMQQILSDEEVNEK
- 2: NVRLTCIGSPVEDEVK
- 3 (C-Terminus): IVYNAAHLDYLQNRV(I)

Für die vollständige Sequenzierung des HvFdx wurden Primer für die Amplifizierung des HvFdx Gens über eine PCR hergestellt. Zum einen wurden Primer verwendet, die komplementär sind zu dem 5'- und dem 3'- Ende des HsFdx Gens. Zum anderen wurden Wobble Primer entworfen, die für die sequenzierten N- und C-terminalen Aminosäuren des HvFdx kodieren.

Nur die PCR mit genomischer DNA aus *H. volcanii* zusammen mit den HsFdx-Primern resultierte in der Amplifizierung eines etwa 400 Basen langen Fragmentes. Das Fragment wurde über ein Gel aufgereinigt, isoliert und für eine Sequenzierungsreaktion eingesetzt. Die Übersetzung in die entsprechenden Aminosäuren lieferte folgende Sequenz:

FDDNGWDLDDDDGLFDQA?DAGLDAEDYGEMEVNQGEYILEAAEAQGYDWPFCRA  
GACANCAAIVKEGEIDMDMQQILSDEEVNEKNVRLTCIGSPVEDEVKIVYNAKHLDY  
LQNRVI

**Abbildung 37: Sequenzvergleich von HvFdx, HsFdx und HmFdx.** Erstellt mit dem Programm ClustalW. Die Aminosäuren, die in allen drei Sequenzen identisch sind, wurden rot hinterlegt. Grau hinterlegt wurden die Aminosäuren, die in den drei Sequenzen ähnlich sind.

	10	20	30	40	50	60
<i>H. volcanii</i>	PTVTYLNIEVLDDNGWDLDDDDGLFDQA?DAGLDAEDYGEMEVNQGEYILEAAEAQGYDWP					
<i>H. salinarum</i>	PTVEYLNIEVTLDDNGWDLDDDDGLFDQA?DAGLDAEDYGEMEVNQGEYILEAAEAQGYDWP					
<i>H. marismortui</i>	PTVEYLNIEVVDENGWDMYDDDDGLFDQA?DAGLDAEDYGEMEVNQGEYILEAAEAQGYDWP					
	70	80	90	100	110	120
<i>H. volcanii</i>	FSCRAGACANCAAIVKEGEIDMDMQQILSDEEVNEKNVRLTCIGSPVEDEVKIVYNAKHL					
<i>H. salinarum</i>	FSCRAGACANCAASIVKEGEIDMDMQQILSDEEVNEKNVRLTCIGSPVEDEVKIVYNAKHL					
<i>H. marismortui</i>	FSCRAGACANCAATVLEGEIDMDMQQILSDEEVNEKNVRLTCIGSPVEDEVKIVYNAKHL					
	.... ...					
<i>H. volcanii</i>	DYLQNRVI					
<i>H. salinarum</i>	DYLQNRVI					
<i>H. marismortui</i>	DYLQNRVI					

Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen zeigte, dass beim HvFdx gegenüber HsFdx 15 Aminosäuren ausgetauscht sind, während es im Vergleich zu HmFdx 20 sind; das entspricht im ersten Fall 88% Identität und in letzterem 84%.

HvFdx besitzt wie die halophilen Ferredoxine HsFdx und HmFdx eine acide Extradomäne. Es sind somit keine Besonderheiten festzustellen, die auf einen moderat halophilen Charakter hindeuten.

### 3.5 Übersicht der Ergebnisse

Für HsFdx wurde eine Aufreinigungsstrategie etabliert, mit der das Holo-Ferredoxin in ausreichender Reinheit für die Aufnahme von NMR-Spektren isoliert werden konnte. Des weiteren konnte anhand von Absorptionsmessungen und mit Hilfe der DSC- und der CD-Spektroskopie der halophile Charakter des HsFdx nachgewiesen werden. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass ein Einbau des Eisen-Schwefel-Clusters und die dadurch katalysierte Faltung des HsFdx nur in Gegenwart von Salzkonzentrationen größer 150 mM NaCl erfolgt.

Die NMR-Struktur des HsFdx in Lösung wurde berechnet, wodurch ein Vergleich mit der Kristallstruktur des halophilen Ferredoxins aus *H. marismortui* möglich wurde. Mit Hilfe der NMR-Spektroskopie wurde außerdem festgestellt, daß die Aminosäuren der sauren Extradomäne des HsFdx sich nicht in ihrer Flexibilität von den anderen unterscheiden und die Entfaltung des Proteins nicht von dieser Domäne initiiert wird.

Um den Einfluß der Extra-Domäne auf die Halophilie des HsFdx zu untersuchen, wurde eine Mutante (Fdxana) dargestellt, die anstatt der 30 für halophile Ferredoxine typischen Aminosäuren nahe zum N-Terminus den Loop besitzt, der sich im Ferredoxin aus *Anabaena* an der analogen Stelle befindet. Das rekombinante Protein wurde als Apoferredoxin exprimiert. Auffällig war, dass eine gute Expression des Wildtyp-HsFdx homolog in *H. salinarum* erreicht wurde, während die Mutante nicht in dem halophilen Organismus dargestellt werden konnte (s. Tabelle 14, Kapitel 4.4.3.1). Dafür war eine hohe Expression des Fdxana in *E. coli* zu beobachten. In dem mesophilen Organismus wurde HsFdx seinerseits nur in sehr geringen Mengen als Fusionsprotein mit GST exprimiert.

Fdxana wurde in *E. coli* als Apoprotein erhalten. Der Eisen-Schwefel-Cluster konnte unter Niedrigsalzbedingungen rekonstituiert werden, wodurch allerdings keine Faltung des Proteins erreicht wurde. Trotzdem ließ sich feststellen, dass die Deletion der Extra-Domäne dazu



führte, dass der Eisen-Schwefel-Cluster auch in Abwesenheit von NaCl eingebaut wurde, was bei dem halophilen Ferredoxin aus *H. salinarum* nicht möglich war. Die Deletion der halophilen Insertion bewirkte außerdem, dass Fdxana schon bei Konzentrationen von nur 30% w/v Ammoniumsulfat ausfiel, während HsFdx noch bis zu 70% löslich war. Als weiterer Effekt war zu beobachten, dass Fdxana nicht mehr die für HsFdx zutreffende Stabilisierung mit zunehmender Salzkonzentration aufwies, sondern bei geringeren Salzkonzentrationen stabiler war (s. tabellarische Übersicht in Kapitel 6.3).

## 4 Diskussion

Das Ferredoxin aus dem halophilen Organismus *H. salinarum* zeichnet sich wie andere halophile Proteine durch einen hohen Anteil an negativ geladenen Resten aus. Mesophile Ferredoxine besitzen ebenfalls einen hohen Anteil an Aspartat und Glutamat, ihr pI von 4 ist vergleichbar zu dem des HsFdx. Insofern kann die Adaptierung des HsFdx an Hochsalzbedingungen nicht durch eine größere negative Oberflächenladung erklärt werden.

Der Unterschied der halophilen Ferredoxine zu Pflanzentypferredoxinen besteht in einer Insertion von 30 zusätzlichen Aminosäuren nahe dem N-Terminus; bei 13 der 30 Aminosäuren handelt sich um Aspartat oder Glutamat. Deshalb wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht, ob und inwiefern die zusätzlichen 30 Aminosäuren für die halophilen Eigenschaften des HsFdx verantwortlich sind. In dem Zusammenhang sollte untersucht werden, ob es sich bei dieser Extra-Domäne um ein verbreitetes Strukturmotiv in halophilen Proteinen handelt, welches neben dem erhöhten Anteil an negativen Ladungen in halophilen Proteinen einen zweiten Mechanismus der Anpassung an Hochsalzbedingungen darstellt.

Im Folgenden soll zuerst auf die Berechnung und die Analyse der Struktur des HsFdx in Lösung eingegangen werden. Anschließend wird die Stabilität des HsFdx in Abhängigkeit von der Salzkonzentration mit dem Verhalten anderer halophiler Proteine verglichen. Danach werden die Untersuchungen zum Clustereinbau und der Faltung sowie zur Entfaltung des HsFdx diskutiert. Abschließend wird der Einfluß der Deletion der aciden Extra-Domäne auf die Stabilität und die Faltung des Ferredoxins analysiert und den Eigenschaften mesophiler Ferredoxine und des HsFdx gegenübergestellt.

### 4.1 NMR-spektroskopische Untersuchungen des HsFdx

Es sind nur wenige Strukturen halophiler Proteine bekannt (Richard et al., 2000), (Frolow et al., 1996) (Pieper et al., 1998), bisher existieren Kristallstrukturanalysen oder aufgrund von Homologiebetrachtungen erstellte Modellstrukturen (Britton et al., 1998).

Bei der NMR-Struktur des HsFdx handelt es sich um die erste Strukturbestimmung eines halophilen archaealen Proteins in Lösung. Dies läßt sich auf die im Allgemeinen auftretenden Schwierigkeiten bei der NMR-spektroskopischen Untersuchung halophiler Proteine zurückführen. Viele halophile Proteine denaturieren, wenn die Salzkonzentration der Lösung weniger als 2 M NaCl oder KCl beträgt. Die Durchführung von NMR-Messungen ist allerdings nur bis zu NaCl Konzentrationen von etwa 1.5 M mit einem Standard NMR-

Probenkopf ohne Probleme möglich, da höhere Salzkonzentrationen Störungen des Magnetfeldes mit sich bringen. Aus diesen Gründen war die Auswahl eines geeigneten Modellsystems sehr wichtig. Untersuchungen am HsFdx zeigten, dass das Protein auch in Gegenwart von 450 mM NaCl bei pH 6.5 bei RT über mehrere Tage stabil ist und sich somit für die Analyse mit Hilfe der NMR-Spektroskopie eignet (Abbildung 5). Darüber hinaus wurden ebenfalls Messungen bei einer Salzkonzentration von 1.5 M NaCl durchgeführt, um Aussagen über eventuelle Strukturunterschiede des HsFdx bei den verschiedenen Salzkonzentrationen machen zu können.

#### **4.1.1 Voraussetzung der Probenbeschaffenheit für die Aufnahme der NMR-Spektren vom HsFdx**

In der Regel stellen Verunreinigungen bei NMR-Messungen an Proteinen kein besonderes Problem dar, da interpretierbare NMR-Daten schon von Proteinlösungen erhalten werden, deren Reinheit  $\geq 95\%$  ist. Dies gilt aber nur, solange es sich bei der Verunreinigung um native Proteine handelt. Liegen neben dem Holoprotein noch geringe Mengen an ungefaltetem Apoprotein vor, überlagern die Signale des denaturierten Proteins die des Holoproteins (Abbildung 12). Die Ursache dafür liegt in der geringeren Halbwertsbreite der Signale von flexibel beweglichen Molekülen, die sich in der denaturierten Konformation befinden. Dies führt zu einer signifikant größeren Signalintensität im Vergleich zu den Resonanzen der Atome, die sich im nativen Protein in einer starren Umgebung befinden. Dieser Effekt lässt sich schon anhand eindimensionaler  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren erkennen.

Somit ist für die Aufnahme der NMR-Spektren erforderlich, dass das HsFdx als Holoprotein in hoher Reinheit isoliert wird. Dies war nach dem Kerscher Protokoll für die Isolierung des HsFdx nicht möglich ( $A_{420\text{nm}}/A_{280\text{nm}} = 0.25$ ). Erst die Einführung einer Ammoniumsulfat-fällung der cytosolischen Fraktion aus *H. salinarum* und die Durchführung einer hydrophoben Säule lieferte HsFdx mit einem Absorptionskoeffizienten  $A_{420\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$  von 0.33. Die hydrophobe Chromatographie auf einer Gelfiltrationssäule, die mit einem Ammoniumsulfat-gradienten entwickelt wird, wurde speziell für halophile Proteine etabliert (Eisenberg et al., 1992), (Haar, 1976), (Werber & Mevarech, 1978b). HsFdx ist in 60% w/v  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  löslich, fällt aber in Gegenwart eines Trägermaterials wie z.B. Sepharose4B unter den gleichen Bedingungen aus. Es kann erst bei niedrigeren Ionenstärken von etwa 40%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  wieder von der Säule eluiert werden. Bei dem Apo-HsFdx handelt es sich um ein Protein mit

geringem Sekundärstrukturanteil, wodurch deutlich mehr hydrophobe Gruppen an der Oberfläche des Moleküls liegen. Somit können Holo- und Apoprotein bei unterschiedlichen Ammoniumsulfatkonzentrationen von der hydrophoben Säule eluiert und auf diesem Weg getrennt werden. Holo-HsFdx konnte in ausreichender Reinheit isoliert werden, um aussagekräftige NMR-Spektren aufzunehmen.

#### 4.1.2 Strukturanalyse des HsFdx

Die Struktur des HsFdx in Lösung wurde anhand der Daten aus 2D- $^1\text{H}$ -NMR-Messungen und NMR-Messungen am  $^{15}\text{N}$ - und  $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$  markierten Protein berechnet. Von Kernen, die kürzer als 8 Å vom paramagnetischen Eisen-Schwefel-Cluster entfernt waren, konnten keine NMR-Signale innerhalb des beobachteten Spektrums erhalten werden (Schweimer et al., 2000), (Oh & Markley, 1990). Damit anhand der NMR-Daten eine „ab initio“ Berechnung der Struktur des HsFdx ausschließlich der näheren Umgebung des Eisen-Schwefel-Cluster möglich wurde, war die Doppelmarkierung des HsFdx und die Aufnahme mehrdimensionaler heteronuklearer Spektren notwendig.

Die ersten Strukturberechnungen anhand von NMR-Daten wurden an Metalloproteinen durchgeführt, deren paramagnetische Zentren durch diamagnetische ersetzt wurden. In diesen Fällen wurde eine Beobachtung der Kerne nahe zum aktiven Zentrum möglich. Bei Rubredoxinen wurde das Eisen- durch ein Zinkatom ersetzt, während im 2Fe-2S Putidaredoxin ein Galliumatom anstelle der beiden Eisenatome eingebaut wurde (Blake et al., 1992), (Kazanis & Pochapsky, 1997). Für das 2Fe-2S Ferredoxin aus *Anabaena* gelang es, die beiden Eisenatome durch zwei Galliumatome zu ersetzen (Vo et al., 1997). Die analogen Versuche im Rahmen dieser Arbeit, HsFdx in Gegenwart von  $\text{GaCl}_3$  anstelle von  $\text{FeCl}_3$  zu rekonstituieren, führten nicht zu einem Protein mit geordneter Sekundärstruktur. Somit konnten keine Informationen für die Reste im clusternahen Bereich des HsFdx gewonnen werden.

Die Aminosäurereste und die Struktur im Bereich des aktiven Zentrum sind bei allen Pflanzentypferredoxinen stark konserviert. Deshalb besteht die Möglichkeit, Abstands- und Winkelbeschränkungen für die Aminosäuren nahe zum paramagnetischen Cluster den Kristallstrukturdaten eines bekannten Pflanzentypferredoxins zu entnehmen (Lelong et al., 1995). Auf diese Weise wurden die bisher bekannten Strukturmodelle der Ferredoxine aus *Pseudomonas*, *Synechococcus elongatus* und *Synechocystis* erhalten (siehe Tabelle 1 und 2).

Dieser Ansatz wurde ebenfalls für die Berechnung der Strukturschar des HsFdx eingesetzt, die unter dem PDB-Datenbankeintrag 1EOZ abgelegt wurde. Für das HsFdx wurde aber zusätzlich noch ein zweiter Ansatz gewählt, der die Strukturschar 1E10 ohne Daten aus bekannten Kristallstrukturen für den clusternahen Bereich liefert. In der folgenden Tabelle sind die Distanzbeschränkungen aufgeführt, welche über NOE Intensitäten, Kopplungskonstanten und anhand von Amidprotonenaustauschspektren in D<sub>2</sub>O erhalten wurden.

**Tabelle 9: Vergleich der NMR-Strukturmodelle des HsFdx mit bekannten Strukturen von 2Fe-2S Ferredoxinen in Lösung.** *Pseudomonas* Putidaredoxin (Pochapsky et al., 1994), *Synechocystis* Ferredoxin (Lelong et al., 1995) und *Synechococcus* Ferredoxin (Baumann et al., 1996). Der Ansatz 1E10 für HsFdx wurde ohne Distanzbeschränkungen für den clusternahen Bereich gerechnet, der Clusterbereich der anderen drei Strukturmodelle wurde mit den Daten des *Anabaena* Ferredoxin modelliert.

Protein	Anzahl der Aminosäuren	Anzahl NOE's	Intra-residuell	Sequentiell i-j = 1	Interresiduell mittelweit-reichende	Interresiduell weit-reichend
HsFdx (1E10)	128	1495	436	435	i-j < 5 204	i-j ≥ 5: 419
<i>Pseudomonas</i> Putidaredoxin	106	878	156		i-j ≤ 3 378	i-j > 3 344
<i>Synechococcus elongatus</i> Ferredoxin	97	1720	759	434	i-j ≤ 5 173	i-j > 5 354
<i>Synechocystis</i> Ferredoxin	96	605	191	210	i-j ≤ 3 67	i-j > 3 137

Protein	Winkelbeschränkungen	Wasserstoffbrückenbindungen
HsFdx (1E10)	56	46
<i>Pseudomonas</i> Putidaredoxin	66	-
<i>Synechococcus elongatus</i> Ferredoxin	36	28
<i>Synechocystis</i> Ferredoxin	37	42

**Tabelle 10: Vergleich der *rmsd*-Werte von NMR-Strukturen des HsFdx und verschiedener Pflanzentyp-ferredoxine.**

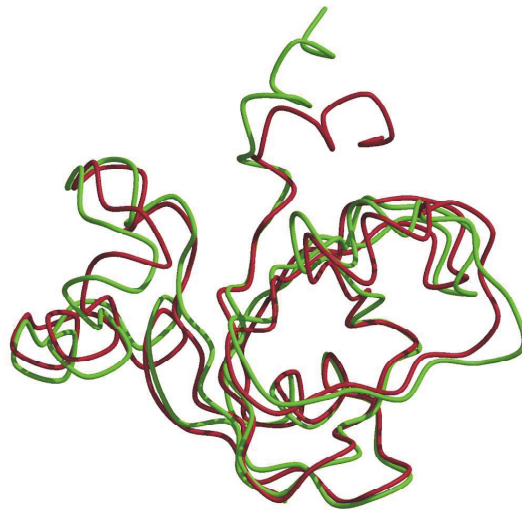
Protein	Anzahl der Strukturmodelle	rmsd ( $C_{\alpha}$ ) [Å]
HsFdx (1E10)	20	0.9
<i>Pseudomonas</i> Putidaredoxin	10	1.14
<i>Synechococcus elongatus</i> Ferredoxin	20	0.87
<i>Synechocystis</i> Ferredoxin	Strukturfamilie	2.2

Für HsFdx konnte eine hohe Anzahl an weitreichenden Distanzbeschränkungen erhalten werden (Tabelle 1). Dies führte auch ohne Distanzbeschränkungen für den clusternahen Bereich zu einer gut definierten Struktur mit einem geringen *rmsd* Wert von 0.9 Å. Der *rmsd* Wert steht für die mittlere Abweichung der Atomkoordinaten in unterschiedlichen Strukturmodellen von den entsprechenden Atompositionen in der gemittelten Struktur.

Der Vergleich der beiden Strukturmodelle von HsFdx zeigte, dass der *rmsd* Wert für die  $C_{\alpha}$  Atome in 1E10 mit 0.9 Å größer war als der für 1EOZ mit 0.8 Å. Doch die globale Faltung beider Strukturscharen ist identisch. Die Distanz- und Winkelbeschränkungen sind also ausreichend für eine Strukturberechnung ohne Daten aus bekannten Kristallstrukturen. Allerdings war es anhand der NMR-Daten nicht möglich, die Orientierung der C-terminalen Helix des HsFdx zum restlichen Protein zu bestimmen. In der Kristallstruktur des zum HsFdx homologen Ferredoxins aus *H. marismortui* (HmFdx) befindet sich der C-Terminus in der Nähe des Eisen-Schwefel-Zentrums (Abbildung 38). Diese Position der C-terminalen Aminosäuren würde auch das Fehlen der weitreichenden NOE Kreuzsignale für diesen Teil des HsFdx erklären.

Die Überlagerung der  $C_{\alpha}$  Positionen der Strukturenschar 1E10 mit der Kristallstruktur von HmFdx liefert einen *rmsd* Wert von 1.22 Å.

**Abbildung 38:** Überlagerung des HsFdx (grün) und des HmFdx (PDB-Datenbankeintrag 1DOI) (rot).



Damit ist die Struktur von HsFdx in Lösung vergleichbar zu der Festkörperstruktur des halophilen HmFdx. Auch die Helices  $\alpha'$  und  $\alpha''$  des HsFdx besitzen in Lösung die gleiche Konformation wie bei HmFdx in der Kristallstruktur. Der Einfluß, den die Extra-Domäne auf die halophilen Eigenschaften des HsFdx hat, kann somit nicht auf strukturelle Besonderheiten dieses Bereichs in Lösung im Vergleich zu seiner Konformation im Festkörper zurückgeführt werden.

Die Steigerung der Salzkonzentration von 0.45 auf 1.5 M NaCl bewirkte ebenfalls keine Strukturänderung. Die Stabilitätsunterschiede bei verschiedenen Salzkonzentrationen lassen sich daher ebenfalls nicht auf strukturelle Ursachen zurückführen.

#### **4.2 Das 2Fe-2S Ferredoxin aus dem moderat halophilen Organismus *H. volcanii***

Bisher waren lediglich die Sequenzen der beiden halophilen 2Fe-2S Ferredoxine aus *H. salinarum* und *H. marismortui* bekannt. Aufgrund ihrer Ähnlichkeit zu Pflanzentypferredoxinen und der geringen Homologie zu Vertebraten-Ferredoxinen wird angenommen, dass lateraler Gentransfer zwischen Halobakterien und Cyanobakterien bzw. Algen für die starke Homologie der Ferredoxine aus diesen unterschiedlichen Organismen verantwortlich ist. Der Unterschied in der Aminosäuresequenz der halophilen Ferredoxine zu den Pflanzentypferredoxinen besteht in der Extra-Domäne nahe dem N-Terminus, in der sich ein hoher Anteil negativer Reste befindet.

Neben halophilen Organismen existieren auch moderat halophile Organismen, die bei Salzkonzentrationen von 2.5-4.3 M NaCl wachsen können, wobei NaCl teilweise durch MgCl<sub>2</sub> ersetzt werden kann (Mullakhanbhai & Larsen, 1975). Das Glykosilierungsmuster der Membran des moderat halophilen Organismus *H. volcanii* unterscheidet sich von dem der halobakteriellen Membran durch das deutlich geringere Vorkommen negativer Ladungen (Mengele & Sumper, 1992). Es besteht die Möglichkeit, dass auch Proteine des moderat halophilen Organismus mit einer geringeren Oberflächendichte an negativen Ladungen auskommen. Auf der Oberfläche der Dihydrofolatreduktase aus *H. volcanii* z.B. sind wie bei der Malatdehydrogenase aus *H. marismortui* (hmMDH) und dem hmFdx Cluster nicht interagierender negativ geladener Reste zu beobachten (Pieper et al., 1998). Allerdings war der Überschuss an aciden Resten der Dihydrofolatreduktase aus *H. volcanii* verglichen zu dem mesophilen Pendant aus *E. coli* (18.5% gegenüber 15.7%) nicht signifikant, so wie es bei anderen halophilen Proteinen im Vergleich zu den analogen mesophilen Proteinen der Fall ist. *H. volcanii* Ferredoxin (HvFdx) wurde isoliert und die Sequenz bestimmt, um eventuelle Unterschiede in Aminosäurezusammensetzung und -sequenz zu HsFdx, sowie gegebenenfalls strukturelle Besonderheiten aufzudecken. Doch die Sequenzhomologie des HvFdx von 88% zu HsFdx und von 84% zu HmFdx sowie das Vorhandensein der aciden Insertion nahe dem N-Terminus, zeigten eindeutig, dass es sich bei HvFdx um ein halophiles Ferredoxin handelt. Aufgrund der hohen Sequenzhomologie zu den beiden strukturell gut untersuchten halophilen Ferredoxinen wurde von einer Strukturanalyse des HvFdx abgesehen.

Vor kurzem wurde die Sequenz eines weiteren halophilen Ferredoxins aus *Haloarcula japonica* veröffentlicht, welches eine Sequenzidentität von 98% zu HmFdx, 89% zu HsFdx und 84% zu HvFdx besitzt (Matsuo et al., 2001). Auch dieses Ferredoxin besitzt den typischen Überschuss von 30 Aminosäuren nahe zum N-Terminus im Vergleich zu Pflanzentypferredoxinen, 13 Aminosäuren sind Glutamat oder Aspartat. Eine Strukturanalyse des Ferredoxins aus *Haloarcula japonica* wurde bislang nicht publiziert.

#### **4.3 Ist HsFdx als Modellsystem für halophile Proteine geeignet?**

Die meisten halophilen Proteine besitzen eine höhere negative Oberflächenladung als ihre mesophilen Analoga (Modellrechnungen von L.-O. Essen, unveröffentlicht). Die Betrachtung der halophilen Ferredoxine hingegen legt nahe, dass es noch einen weiteren Anpassungsmechanismus an Hochsalzbedingungen gibt. Das HsFdx besitzt eine Insertion von 30 Aminosäuren, wobei der Anteil an Aspartat und Glutamat 44% ausmacht. Es konnte



gezeigt werden, dass es sich hierbei um ein wiederholt auftretendes Merkmal halophiler Proteine handelt; etwa 100 weitere Proteine aus *H. salinarum* enthalten eine Sequenz von 28 Aminosäuren, in denen der Anteil an sauren Resten mindestens 44% ausmacht (Suchfunktion von V. Hickmann, unveröffentlicht).

Bevor auf die strukturellen Besonderheiten des HsFdx eingegangen wird, sollen die Eigenschaften des Ferredoxins im Vergleich zu anderen halophilen Proteinen diskutiert werden.

#### 4.3.1 Die Stabilität des HsFdx in Abhängigkeit von der Salzkonzentration im Vergleich zu anderen halophilen Proteinen

Halophile Proteine zeichnen sich dadurch aus, dass ihre Stabilität mit der NaCl bzw. der KCl Konzentration steigt. In Gegenwart von 4 M NaCl sind sie bei Raumtemperatur über Monate stabil. Folgende Enzyme und Proteine halophiler Organismen wurden bisher auf ihre Stabilität und Aktivität in Abhängigkeit von der Salzkonzentration untersucht:

**Tabelle 11: Übersicht über die bisher auf ihre Stabilität und/oder Aktivität in Abhängigkeit von der Salzkonzentration untersuchten halophilen Proteine.**

Protein	Organismus	Abkürzung	Literaturstelle
Malatdehydrogenase EC 1.1.1.37	<i>H. marismortui</i>	HmMDH	(Mevarech et al., 2000)
Glutamatdehydrogenase EC 1.4.1.4	<i>H. marismortui</i>	HmGDH	(Leicht et al., 1978)
Glutamatdehydrogenase EC 1.4.1.4	<i>H. salinarum</i>	HsGDH	(Britton et al., 1998)
Glutamatdehydrogenase EC 1.4.1.4	<i>H. mediterranei</i>	HmeGDH	(Ferrer et al., 1998)
Glucosedehydrogenase EC 1.1.1.47	<i>H. salinarum</i>	HsGlucDH	(Madan & Sonawat, 1996)
Glucosedehydrogenase EC 1.1.1.47	<i>H. mediterranei</i>	HmeGlucDH	(Bonete et al., 1996)
Glycerinaldehyd-3- Phosphat-Dehydrogenase EC 1.2.1.12	<i>H. vallismortis</i>	HvalGAPDH	(Ebel et al., 1995)

Dihydrolipoamid-Dehydrogenase EC 1.8.1.4	<i>H. volcanii</i>	HvDHLDH	(Jolley et al., 1997)
Dihydrofolatreduktase EC 1.5.1.3	<i>H. volcanii</i>	HvDHFR	(Pieper et al., 1998, Zusman et al., 1989)
Katalase-Peroxidase Katalase EC 1.11.1.6 Peroxidase EC 1.11.1.7	<i>H. marismortui</i>	HmKP	(Cendrin et al., 1994)
Elongationsfaktor Tu EC 3.6.1.48	<i>H. marismortui</i>	HmEFTu	(Ebel et al., 1992)
Ferredoxin	<i>H. marismortui</i>	HmFdx	(Frolow et al., 1996)
Ferredoxin	<i>H. salinarum</i>	HsFdx	(Bandyopadhyay et al., 2000, Bandyopadhyay & Sonawat, 2000)

Ein weiteres Merkmal halophiler Proteine ist ihre geringe Stabilität und Funktionalität in Niedrigsalzlösung. Multimere halophile Enzyme dissoziieren bei Konzentrationen kleiner 1.2-2 M NaCl, und viele monomere halophile Proteine denaturieren unter diesen Bedingungen.

HsFdx behält auch in 430 mM NaCl seine Struktur über einige Tage bei. Selbst in 150 mM NaCl dauert es über 24 Stunden, bis HsFdx vollständig denaturiert ist. Für ein Protein aus einem halophilen Organismus ist diese Stabilität unter Niedrigsalzbedingungen außergewöhnlich. Die Halbwertszeit der HmMDH in Abwesenheit ihres Kofaktors NADH in 70 mM NaCl beträgt im Gegensatz zum HsFdx bei RT weniger als eine Minute. Die Halbwertszeit der HvalGAPDH in 0.5 M KCl liegt bei RT um 12 h.

Da sich andere halophile Proteine unter Niedrigsalzbedingungen schneller entfalten als HsFdx, wurde es auch als halotolerant bezeichnet. Halotoleranz würde aber bedeuten, dass hohe Salzkonzentrationen toleriert werden, jedoch keine zusätzliche Stabilisierung mit sich bringen.

Gegen die Klassifizierung des HsFdx als halotolerant spricht somit die zunehmende Stabilität des Proteins mit wachsender Salzkonzentration, die sowohl anhand der UV-VIS-spektroskopischen Untersuchungen bei Raumtemperatur, der temperaturabhängigen Denaturierung und mit Hilfe der DSC- und CD-Messungen eindeutig nachgewiesen wurde.

In 4.3 M NaCl beginnt die Denaturierung des HsFdx erst bei Temperaturen oberhalb von 65 °C und die Halbwertszeit bei 67 °C beträgt 10 h. Es wurde für viele halophile Proteine beobachtet, dass sie sich in 4 M NaCl erst bei Temperaturen größer 60 °C entfalten. Bei HvDLDH ist die Temperaturstabilität sogar so stark ausgeprägt, dass die Entfaltung erst ab einer Temperatur von 100 °C beginnt (Jolley et al., 1997) (Tabelle 12).

Betrachtet man die Stabilität des HsFdx bei niedrigen Salzkonzentrationen im Vergleich zur HmMDH, so ist festzustellen, dass die Halbwertszeit vom HsFdx in 150 mM NaCl und die Halbwertszeit der HmMDH in 70 mM NaCl in Gegenwart von geringen Mengen an NADH in der gleichen Größenordnung liegen. Der Kofaktor NADH wirkt stabilisierend auf die tetramere Struktur des HmMDH. Ebenso wie der Kofaktor bewirkt der kovalent gebundenen Eisen-Schwefel-Cluster im HsFdx, dass die Sekundärstruktur des Ferredoxins auch bei geringen Salzkonzentrationen bei Raumtemperatur über einige Tage erhalten bleibt.

Die Temperaturen  $T_m$  aus den DSC- und CD-Messungen am HsFdx mit  $T_m$  (100 mM NaCl) = 49.5 °C <  $T_m$  (430 mM NaCl) = 56 °C <  $T_m$  (4.3 M NaCl) = 85 °C stehen für eine deutliche Stabilisierung des Proteins mit zunehmender Salzkonzentration.

**Tabelle 12: Übersicht zu den Halbwertszeiten halophiler Proteine in Abhängigkeit von der Salzkonzentration und der Temperatur.**

Protein	NaCl-Konzentration	Temperatur	Halbwertszeit
HsFdx	4.3 M	67 °C	10 h
HsFdx	430 mM	65 °C	10 min
HmMDH	4 M	63 °C	8.5 h (Madern et al., 1995)
HmMDH	70 mM	RT	< 1 min
HmMDH (mit 10 µM NADH)	70 mM	RT	48 h
HmedGDH	2 M	67 °C	27 min (Ferrer et al., 1998)
HmedGDH	4 M	67 °C	70 h
HmGDH	4.3 M	65 °C	11 h (Leicht et al., 1978)
HvalGAPDH	1 M KCl	RT	72 h (Krishnan & Altekari, 1993)
HvalGAPDH	0.5 M KCl	RT	12 h
Hv Citrat-Synthase	0.2 M KCl	RT	48 h (Connaris et al., 1999)

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Stabilität des HsFdx in 4.3 M NaCl bei Raumtemperatur und die Halbwertszeit der Denaturierung bei 67 °C charakteristisch sind für ein halo-

philes Protein. Die zunehmende Stabilisierung dieses Ferredoxins mit steigender NaCl-Konzentration spricht ebenfalls dafür, dass es sich bei HsFdx nicht um ein halotolerantes, sondern um ein halophiles Protein handelt.

#### **4.3.2 Faltung und Rekonstitution des HsFdx sind abhängig von der NaCl-Konzentration**

Bisher existieren nur wenige Untersuchungen, inwiefern die Salzkonzentration die Faltung eines halophilen Proteins beeinflusst (Mevarech et al., 2000). Es ist bekannt, dass einige halophile Proteine, wie z.B. das CheY aus *H. salinarum* in Niedrigsalzlösung denaturieren und durch Dialyse gegen 2 M NaCl wieder zurückgefaltet werden können (Schmitt, 1997). Ebenso kann die Aktivität von HmMDH durch Dialyse gegen Hochsalzlösung wiederhergestellt werden. In diesem Zusammenhang wurde aber festgestellt, dass eine Tetramerisierung der HmMDH Monomere nur in Gegenwart von NaCl erfolgt und nicht durch den Kofaktor NADH bewirkt werden kann, obwohl dieser in der Lage ist, das halophile Enzym in Niedrigsalzlösung deutlich zu stabilisieren.

Die Entfaltung von HsFdx ist nicht reversibel, da der kovalent gebundene Eisen-Schwefel-Komplex bei einer Denaturierung des Proteins zerfällt. Aber die Rekonstitution des Clusters konnte in Gegenwart von Eisensulfat und Dinatriumsulfid erreicht werden. Die Effizienz des Eiseneinbaus wurde in Abhängigkeit von der Salzkonzentration untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass HsFdx in Niedrigsalzlösungen, die 150 mM NaCl enthielten, nicht rekonstituiert werden konnte. In 430 mM NaCl konnte ein Teil des HsFdx in nativer Form erhalten werden. Erst in Gegenwart von 2 M NaCl war ein vollständiger Wiedereinbau des Eisen-Schwefel-Komplexes möglich.

Das bedeutet, dass die native Faltung und die Rekonstitution des 2Fe-2S-Clusters des HsFdx in einem mesophilen Organismus nicht möglich ist, sondern nur im Cytoplasma halophiler Archaea erreicht werden kann.

#### **4.3.3 Homogene Flexibilität der Aminosäurereste und gleichzeitige Entfaltung der verschiedenen Strukturelemente des HsFdx**

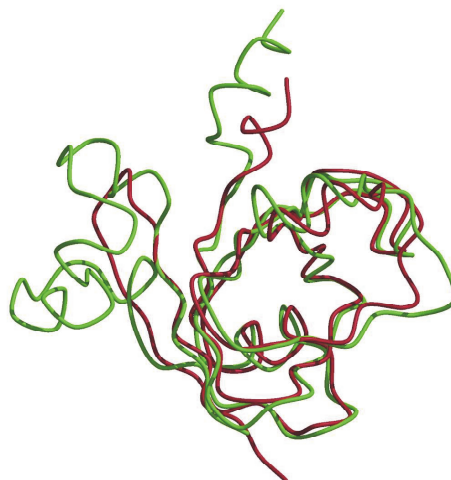
Die Addition vieler Wechselwirkungen geringer Energie (Wasserstoffbrückenbindungen, elektrostatische und hydrophobe Wechselwirkungen) machen die Stabilität eines Proteins aus. Da die NMR-Untersuchungen keine Strukturunterschiede für das HsFdx bei 450 mM NaCl

und 1.5 M NaCl erkennen ließen, muss es einen anderen Grund für die Energiedifferenz des nativ gefalteten HsFdx bei verschiedenen Salzkonzentrationen geben. Eine Möglichkeit besteht in der Änderung der Flexibilität der Aminosäuren, die eine Variation der Stärke von Wasserstoffbrückenbindungen und hydrophoben Kontakten bewirken kann.

Der Aminosäureaustausch eines Tryptophans gegen ein Glycin im Trypsininhibitor BPTI z.B. führte zu einer Destabilisierung des Proteins um 5 kcal/mol und einer 250fach niedrigeren Affinität zu Trypsin (Goldenberg et al., 1991). Die deutlich größere Flexibilität einiger Reste der Mutante im Vergleich zum Wildtyp-BPTI ist erkennbar an ihren höheren transversalen  $^{15}\text{N}$ -Relaxationsraten (Beeser et al., 1997). Für das Gallium-substituierte Putidaredoxin konnten Flexibilitätsunterschiede anhand der  $^{15}\text{N}\{^1\text{H}\}$  NOEs für einzelne Reste festgestellt werden (Kazanis & Pochapsky, 1997).

HsFdx kann gedanklich in zwei Teile aufgeteilt werden: auf der einen Seite befindet sich der in Pflanzentypferredoxinen konservierte Bereich um das aktive Zentrum mit einem großen hydrophoben Kern, und auf der anderen Seite die 30 Aminosäuren nahe dem N-Terminus, die zwei  $\alpha$ -Helices mit einem eigenen hydrophoben Kern ausbilden, welche in einem raumfüllenden Modell als saure Extra-Domäne zu erkennen sind (s. Abbildung 41).

**Abbildung 39: Überlagerung des HsFdx (grün) und des Anabaena Ferredoxins** (PDB Datenbankeintrag 1FRR) (rot). Diese Ausrichtung der beiden Moleküle wurde für die GRASP-Oberflächendarstellung (Abbildung 42) ausgewählt.



**Abbildung 40: Abbildung der Oberflächenladung von HsFdx (links) und *Anabaena* Ferredoxin (rechts).** Erstellt mit dem Programm „GRASP“. Saure Reste sind in rot dargestellt, positive Reste in Blau, für die Skala wurden die Werte -30, 0, 30 gewählt. Für die Salzkonzentration wurde 0.1 M angegeben. Die saure Extradomäne mit den Helices  $\alpha'$  und  $\alpha''$  ist durch eine Ellipse gekennzeichnet.



Die Messung der Aminosäureflexibilitäten des HsFdx ergaben keine Unterschiede für die transversalen  $^{15}\text{N}$ -Relaxationsraten von Resten aus dem konservierten Bereich und solchen aus der sauren Extradomäne bei einer Salzkonzentration von 450 mM NaCl. Falls die Salzkonzentration einen Einfluß auf die Aminosäureflexibilität hat, so wirkt sie uniform auf alle durch die NMR-Spektroskopie beobachtbaren Aminosäurereste des HsFdx.

Die NMR-spektroskopische Untersuchung der thermischen Denaturierung des HsFdx ergab, dass es sich bei der Entfaltung um einen Prozeß handelt, der in verschiedenen Bereichen des Proteins gleichzeitig stattfindet. Die Intensitätsabnahme der beobachtbaren NMR-Signale besitzt für fast alle Aminosäuren einen identischen Zeitverlauf. Die Entfaltung der Extradomäne findet also nicht schneller statt als die des restlichen Proteins und somit ist sie nicht der Ausgangspunkt für die Denaturierung des HsFdx.

#### 4.4 Funktion der Extradomäne

Da die strukturelle Untersuchung der aciden Extradomäne keinen Aufschluß über die Wirkungsweise der zusätzlichen dreißig Aminosäuren in halophilen Proteinen gab, wurde sie durch die jeweiligen Strukturelemente aus mesophilen Pflanzentypferredoxinen ersetzt, um ihre Funktion aufzuklären.

#### 4.4.1 Natur der Extra-Domäne

Die Extra-Domäne des HsFdx fällt durch den hohen Anteil negativer Reste auf. Es handelt sich bei zehn der Aminosäurereste 7-36 um Aspartat, drei weitere sind Glutamat. Dieser Bereich des HsFdx enthält also zu 44% negative Aminosäuren. Dabei fällt die für halophile Proteine typische Bevorzugung von Aspartatresten auf. Die Aspartatseitenkette ist um eine CH<sub>2</sub>-Einheit kürzer als die Glutamatseitenkette, insofern können sterische Aspekte den Ausschlag geben für die Bevorzugung von Aspartatresten. Ebenso können Entropieeffekte eine Rolle spielen, da eine Orientierung der Wassermoleküle um die Methylgruppen erfolgt. Die längere Glutamatseitenkette bewirkt somit eine stärkere Ordnung der Solvensmoleküle.

In Tabelle 13 sind einige charakteristische Merkmale des HsFdx denen des Ferredoxins aus *Anabaena* gegenübergestellt. Außerdem sind zum weiteren Vergleich auch die pI Werte und die Aminosäurezusammensetzung für die Mutante Fdxana und für die im Fdxana deletierte Extra-Domäne des HsFdx aufgeführt.

**Tabelle 13: Vergleich der Aminosäurezusammensetzung des HsFdx mit dem Ferredoxin aus *Anabaena*, der Mutante Fdxana und der deletierten Extra- Domäne des HsFdx.**

	HsFdx	Ferredoxin aus <i>Anabaena</i>	Fdxana	Insertion (Extra-Domäne)
Anzahl der AS	128	98	104	30
pI	3.82	3.95	4.09	3.36
Asp	17	11	7	10
Glu	16	10	15	3
Arg	3	1	3	0
Lys	5	4	4	1
Asp + Glu	33 (26%)	21 (21%)	22 (21%)	13 (44%)
Arg + Lys	8	5	7	1

Ein weiteres Merkmal der Extra-Domäne ist die strukturelle Einheit dieses Bereichs (siehe Abbildung 41). Die zwei amphiphilen  $\alpha$ -Helices sind nach außen stark negativ geladen und bilden an der Kontaktstelle zueinander einen kleinen hydrophoben Kern aus.

#### 4.4.2 Übersicht über bisher bekannte Strukturmerkmale halophiler Proteine

Bisher existieren zwei Kristallstrukturen der halophilen Proteine HmMDH und HmFdx (Richard et al., 2000), (Frolow et al., 1996). Außerdem wurden Strukturen der HsGDH und der HvDLDH modelliert. Diese zeigen ebenso wie die Kristallstrukturen, dass die negativen Ladungen über die Oberfläche des Proteins verteilt vorliegen. Die aktiven Zentren jedoch befinden sich in einem hydrophoben Bereich, so wie es auch in den mesophilen Analoga der Fall ist (Britton et al., 1998), (Pieper et al., 1998).

Als mögliche Funktion der großen Anzahl an Carboxylatresten wurde ihre hohe Wasserbindungskapazität angeführt. Es wurde ein Modell entworfen, nachdem die negativen Reste eine Hydrathülle mit komplexierten Anionen und Kationen um die HmMDH ausbilden (Zaccai et al., 1989), (Richard et al., 2000). Die Wasser- und Ionenbindungskapazität einiger halophiler Enzyme wurde mit Hilfe von Neutronenbeugungsexperimenten und analytischen Dichte-Ultrazentrifugations- und Lichtstreuungsmessungen bestimmt. Die halophile GAPDH bindet in 4 M KCl 0.18 g(H<sub>2</sub>O)/g(Protein) und 0.07 g(KCl)/g(Protein) (Ebel et al., 1995), der Elongationsfaktor HmEFTu 0.4 g(H<sub>2</sub>O)/g(Protein) und 0.2 g(KCl)/g(Protein). Das mesophile Protein BSA hingegen bindet ebenfalls 0.2 g(H<sub>2</sub>O)/g(Protein), aber keine anorganischen Kationen.

Die Wasserbindungskapazität von HsFdx oder HmFdx ist bisher nicht untersucht worden. Dafür konnte in der Kristallstruktur des HmFdx im Vergleich zur Kristallstruktur des mesophilen Lysozyms zwar kein höherer Anteil an gebundenen Wassermolekülen festgestellt werden, aber zu den in der Kristallstruktur des hmFdx vorhandenen Wassermolekülen werden 40% mehr Wasserstoffbrückenbindungen ausgebildet als im Lysozym (Frolow et al., 1996).

In der Kristallstruktur der HmMDH konnte aufgrund der geringen Auflösung von 2.6 Å nur ein Natriumion an der Fläche zwischen zwei Monomeren zugeordnet werden. Dies ist an der Ausbildung einer komplexen Salzbrückenbindung der Untereinheiten beteiligt. Auch in der Kristallstruktur des Ferredoxins aus *H. marismortui* wurden nur sechs Kaliumionen entdeckt. Ein Großteil dieser Kaliumionen ist nicht über Carboxylatgruppen gebunden, sondern sie werden von Carbonylgruppen des Peptidrückgrates komplexiert (Frolow et al., 1996). Über die Komplexierung von Kationen kann somit die Funktion des hohen Anteils an Carboxylatgruppen an der Oberfläche nicht erklärt werden. Da die Kristalle des HmFdx in Gegenwart von 4 M K/Na-Phosphat und nicht von Na/KCl erhalten wurden, kann dies allerdings auf den Einfluß der verschiedenen Salze zurückzuführen sein.



Die NMR-Strukturanalyse von HsFdx kann keine Auskunft über die Bindung von Natriumionen durch spezifische Carboxyl- oder Carbonylfunktionen liefern. Die Resonanz der Protonen der Wassermoleküle wird mit Hilfe einer Pulssequenz unterdrückt, da die Signalintensität der Wasserprotonen die Resonanzen des Proteins überdecken würden.

Um den hohen Anteil an negativen Ladungen zu erklären, wurde neben der Wasser- und Ionenbindung ihre elektrostatische Abstoßung als mögliche Funktion in der Literatur diskutiert. Die elektrostatische Wechselwirkung kann zum einen der Tendenz von Proteinen entgegenwirken, bei steigender Ionenstärke zu agglomerieren. Zum anderen kann sie eine ausreichende Flexibilität bei hohen Salzkonzentrationen gewährleisten. Die Abschirmung der negativen Ladungen auf der Oberfläche eines halophilen Proteins durch den Einbau von hydratisierten Kationen sollte allerdings schon bei niedrigen Salzkonzentrationen von etwa 0.2 M vollständig sein, wie es für negativ geladene Makromoleküle wie die DNA und Polyglutamat der Fall ist. Dieser Effekt kann somit nicht als Erklärung für die zunehmende Stabilität halophiler Proteine in Salzkonzentrationen oberhalb von 1 M NaCl oder KCl herangezogen werden. Ebenso kann die unterschiedliche Wirkung von verschiedenen Anionen, die sie auf die Aktivität der HmMDH haben (Ebel et al., 1999a), nicht auf die Abschirmung der negativen Ladungen durch die Komplexbildung von Kationen zurückgeführt werden.

Neben dem erhöhten Vorkommen negativer Reste ist auch ein geringerer Anteil an sterisch anspruchsvollen hydrophoben Resten in halophilen Proteinen zu beobachten. An ihrer Stelle werden verstärkt kleine hydrophobe Aminosäuren gefunden (s. Abbildung 1). Die hydrophoben Wechselwirkungen in einem Protein sind aber nicht nur von der Salzkonzentration abhängig, sondern auch von der Ionenart. Deshalb wird angenommen, dass neben der Abschirmung der negativen Ladungen durch den Einbau von Kationen und der stärkeren Hydratisierung eines halophilen Proteins die veränderten hydrophoben Wechselwirkungen unter Hochsalzbedingungen wichtig sind für seine Stabilität und Aktivität.

Zusammenfassend läßt sich zu den Merkmalen halophiler Proteine sagen, dass sie aufgrund des hohen Anteils an negativen Resten Wassermoleküle fester binden können. Die Beteiligung der Carboxylatgruppen an der Komplexbildung von Kationen und damit ihre Funktion konnte allerdings bisher noch nicht zweifelsfrei geklärt werden.

#### 4.4.2.1 Exkurs: Funktion der Carboxylatreste in Pflanzentypferredoxinen

Mesophile Ferredoxine zeichnen sich ebenfalls durch einen ungewöhnlich hohen Anteil an negativ geladenen Resten aus. Der pI Wert von ca. 4 ist vergleichbar zu dem pI der meisten halophilen Proteine. Da das Cytosol mesophiler Organismen nur etwa 150 mM NaCl enthält, müssen die Glutamat- und Aspartatreste der Pflanzentypferredoxine einem anderen Zweck dienen als der Komplexierung von cytosolischen Kationen.

Bei Ferredoxinen handelt es sich um Elektronenakzeptoren. Redoxreaktionen können auf unterschiedliche Weise reguliert werden, dazu gehören thermodynamische Faktoren wie die Redoxpotentiale der beteiligten Proteine, Abstand und relative Orientierung der Redoxzentren, die Zusammensetzung der Proteinmatrix, sowie die Beschaffenheit der wechselwirkenden Oberflächen zwischen Enzym und Kofaktor.

Der hohe Anteil negativer Ladungen in Pflanzentypferredoxinen kann z.B. durch die Nettoladung das Reduktionspotenzial beeinflussen. Bei Mutationsstudien, in denen Carboxylatfunktionen durch ihre ungeladenen Carboxamid-Analoga ersetzt wurden, ließ sich allerdings kein eindeutiger Einfluß der Mutation auf das Reduktionspotential nachweisen (Swartz et al., 1996), (Brerenton et al., 1999). Nur der Austausch E94K/Q im *Anabaena* Ferredoxin führte zu einer positiven Änderung des Reduktionspotentials von -384 auf -304 mV (Hurley et al., 1997), während für die Mutation E94D kein Einfluß auf das Redoxpotential festgestellt werden konnte (Hurley et al., 1997).

Der Einfluß negativ geladener Seitenketten auf der Oberfläche des Proteins wird in wäßriger Lösung stark abgeschwächt. Untersuchungen in Abhängigkeit von der Ionenstärke ergaben, dass die Reduktion der Ferredoxin-NADP<sup>+</sup>-Reduktase (FNR) durch Ferredoxin aus *Anabaena* bei einer Konzentration von 100-150 mM NaCl maximal ist, bei höheren Salzkonzentrationen jedoch stark abnimmt (Hurley et al., 1997), (Hurley et al., 1996). In der direkten Umgebung von 8-10 Å zum Eisen-Schwefel-Cluster befinden sich ausschließlich ungeladene Aminosäuren. In dem Zusammenhang wurde festgestellt, dass vor allem die Anzahl der Wasserstoffbrückenbindungen zu Resten in der Nähe des aktiven Zentrums einen Einfluß auf das Redoxpotential hat.

Weiterhin wurde untersucht, ob die negativen Ladungen essentiell sind für die Wechselwirkung der Elektronenakzeptoren mit dem zugehörigen Enzym. Der Austausch der Aminosäuren D57A und D60A bewirkt im *Synechocystis* Ferredoxin eine Änderung seiner Dissoziationskonstante zum Photosystem I (Guillouard et al., 2000), obwohl an der

Komplexbildung vor allem der C-Terminus des aus 96 Aminosäuren bestehenden Ferredoxins beteiligt ist (Lelong et al., 1994).

Eine Änderung der Elektronenakzeptoreigenschaften durch den Ersatz von aciden Resten konnte nur in vereinzelten Fällen festgestellt werden (Kümmerle et al., 2000).

Das Redoxpotential von HsFdx ist nur geringfügig von der Salzkonzentration abhängig (Kerscher, 1976). In Abwesenheit von Salz bei pH 8.0 wurde das Mittelpunktspotential zu -345 mV bestimmt, in 3 M KCl zu -360 mV. Bei einem pH Wert von 7.0 liegt das Potential des halobakteriellen Ferredoxins in einer salzfreien Lösung bei -340 mV. Damit nimmt das HsFdx eine Mittelstellung zwischen den Pflanzentypferredoxinen mit -420 mV und den bakteriellen Ferredoxine mit etwa -250 mV ein. Kerscher stellte außerdem fest, dass HsFdx nicht das Spinatferredoxin als Elektronenträger ersetzen kann bei der Elektronenübertragung vom Photosystem I zum  $\text{NADP}^+$ . Statt dessen kann HsFdx in 2 M KCl ein Elektron auf  $\text{NAD}^+$  übertragen. Die Aktivitätsmessungen an der Pyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase wurden in Gegenwart von 3 M KCl durchgeführt (Kerscher, 1980); die Aktivität belichteter Spinat-Chloroplasten geht schon bei Salzkonzentrationen von 0.6 M auf Null zurück (Kerscher, 1976). Die Redoxreaktionen, an denen HsFdx beteiligt ist, finden unter Hochsalzbedingungen statt, welche eine Funktion des entsprechenden mesophilen Enzyms unmöglich machen.

#### 4.4.3 Deletion der aciden Extradomäne des HsFdx

Um den Einfluß der aciden Extra-Domäne des HsFdx zu untersuchen, wurden Mutanten hergestellt, in denen dieser Bereich des Proteins deletiert ist. Da die Helices  $\alpha'$  und  $\alpha''$  die  $\beta$ -Faltblätter  $\beta_1$  und  $\beta_2$  verbinden, wurde in der Mutante Fdxana diese Insertion gegen den Loop aus dem Pflanzentypferredoxin aus *Anabaena* ausgetauscht. In der Mutante Fdxequi nimmt diesen Platz der Turn aus *E. arvense* ein.

Die Mutante Fdxana besitzt den gleichen prozentualen Anteil an sauren Aminosäuren wie das Ferredoxin aus *Anabaena*, da es aber zwei positive Reste mehr trägt, liegt sein pI mit 4.09 geringfügig höher als der des Pflanzentypferredoxins mit 3.98 (siehe Tabelle 13).

Die Deletion der Extra-Domäne des HsFdx führt dazu, dass die Mutante Fdxana eine starke Ähnlichkeit bezüglich der Sequenz und Aminosäurezusammensetzung zu Pflanzentypferredoxinen aufweist. Insofern war zu erwarten, dass Fdxana eine ähnliche Struktur wie das

Ferredoxin aus *Anabaena* ausbildet. Das rekombinante Protein sollte also ähnliche Eigenschaften besitzen wie die homologen mesophilen Pflanzentypferredoxine.

#### 4.4.3.1 Expressionslevel des FdxWt und der Mutanten

Bisher wurden einige Ferredoxine rekombinant in *E. coli* exprimiert. Die Proteine konnten zum Teil als Holoprotein wie z.B. im Fall des *Pseudomonas putida* Ferredoxins, des Spinatferredoxins und des Adrenodoxins („bovine ferredoxin“) oder als Apoproteine isoliert werden (Mo et al., 1999), (Aliverti et al., 1997), (Bernhardt et al., 1998). *Anabaena* Ferredoxin und humanes Ferredoxin wurden in *E. coli* als Apoprotein exprimiert.

Studien über die Ferredoxinexpression zeigten, dass der Einbau des Eisen-Schwefel-Clusters den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt darstellt. Durch die Koexpression des *isc* („iron-sulfur-cluster“-) Genclusters konnte der Anteil an Holoprotein bedeutend erhöht werden (Nakamura et al., 1999), (Agar et al., 2000), (Zheng et al., 1998).

Die literaturbekannten Expressionen halophiler Proteine in *E. coli* zeigten, dass die rekombinanten Proteine vor allem in unlöslicher Form in Einschlußkörpern exprimiert werden und erst durch Rückfaltung in Gegenwart von 2 M NaCl oder KCl in die native Form gebracht werden können. Als Beispiele sind die Expression des CheY aus *H. salinarum* (Schmitt, 1997), des HvDHLDH und der Citratsynthase aus *H. volcanii* (Schmitt, 1997), (Connaris et al., 1999) und der HvDHFR (Blecher et al., 1993) zu nennen. Die HmMDH hingegen konnte als lösliches Protein in großen Mengen in *E. coli* produziert werden und anschließend durch Dialyse gegen Hochsalzlösung von der inaktiven in die aktive Form gebracht werden.

In der Tabelle 14 ist aufgeführt, in welchem Organismus und wie gut die verschiedenen Konstrukte des WtFdx und seiner beiden Mutanten exprimiert werden konnten. Bei der Expression des rekombinant erzeugten HsFdx und seiner Mutanten fiel auf, dass das halophile Protein HsFdx in *H. salinarum* homolog exprimiert wird, aber nicht heterolog in *E. coli*. Nur als Fusionsprotein gekoppelt an die Glutathion-S-Transferase konnte es in geringen Mengen in *E. coli* als Apoprotein ohne Eisen-Schwefel-Cluster erhalten werden. Die Induktion und damit die Produktion des GST-FdxWt hemmte das *E. coli* Zellwachstum deutlich. Die Expression der GST-Fusionsproteine der Mutanten hatte im Gegensatz dazu keinen negativen Einfluß auf das Zellwachstum.

Das Ferredoxin aus *H. japonica* konnte ebenfalls in *E. coli* als GST-Fusionsprotein exprimiert werden, aber auch in diesem Fall handelte es sich um das Apoprotein (Matsuo et al., 2001).

Diese Feststellung ebenso wie die Rekonstitutionsexperimente am HsFdx sprechen dafür, dass der Einbau des Eisen-Schwefel-Clusters in halophilen Ferredoxinen ausschließlich unter Hochsalzbedingungen erfolgt.

Fdxana konnte seinerseits nur im mesophilen Organismus *E. coli* exprimiert werden, und Fdxequi wurde nur als Fusionsprotein GST-Fdxequi erhalten.

**Tabelle 14: In den Tabellen ist aufgeführt, wie effektiv die unterschiedlichen Konstrukte in den verschiedenen Organismen exprimiert werden konnten: ++ gute Überexpression, + Überexpression, (+) geringe Expression, - keine Expression detektierbar.**

Protein	Expression im halophilen Organismus <i>H. salinarum</i>	Protein	Expression im mesophilen Organismus <i>E. coli</i>
FdxWt(His) <sub>6</sub>	(+)	FdxWt	—
Fdxana(His) <sub>6</sub>	—	Fdxana	++
Fdxequi(His) <sub>6</sub>	—	Fdxequi	—
BR-FdxWt	++	GST-FdxWt	+
BR-Fdxana	—	GST-Fdxana	++
BR-Fdxequi	—	GST-Fdxequi	++

Somit wurde das halophile Protein HsFdx nur im halophilen Organismus *H. salinarum* stark überexprimiert. Diese Experimente im Zusammenhang mit der bevorzugten Expression anderer halophiler Proteine in *E. coli* als Einschlußkörper deuten darauf hin, dass HsFdx in *E. coli* exprimiert, jedoch als ungefaltetes Protein erkannt und abgebaut wird. Proteine, die in *E. coli* nicht gefaltet werden, die aber in der denaturierten Form aggregieren, sind in Einschlußkörpern vor dem Abbau durch Proteasen geschützt. HsFdx liegt jedoch auch in der ungefalteten Apofom bei niedrigen Salzkonzentrationen löslich vor und bildet deshalb keine Einschlußkörper.

Die Expression der Mutante in *E. coli* hingegen ist ein Hinweis darauf, dass der halophile Charakter des HsFdx auf die aciden Extra-Domäne zurückzuführen ist. Die Deletionsmutante wird wie einige andere mesophile Ferredoxine als Apoprotein in *E. coli* exprimiert.

#### 4.5 Clustereinbau, Faltung und Stabilität von Fdxana

Da die Mutante Fdxana nur als Apoprotein ohne geordnete Sekundärstruktur erhalten wurde, mußten Bedingungen gefunden werden, unter denen eine Faltung und der Einbau des Eisen-

Schwefel-Clusters stattfindet. Zuerst soll ein Überblick über die bisher eingesetzten Rekonstitutionsmethoden für Ferredoxine und die Stabilität von Pflanzentypferredoxinen gegeben werden, bevor auf die Rekonstitution des Fdxana eingegangen wird.

#### 4.5.1 Überblick über Faltung und Rekonstitution von Ferredoxinen

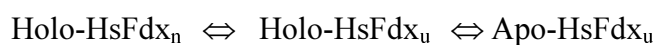
Für das Ferredoxin aus *Anabaena* und das humane Ferredoxin, welche beide in *E. coli* als Apoprotein erhalten wurden, sind Rekonstitutionsprotokolle für die Eisen-Schwefel-Cluster in der Literatur bekannt. Die Methoden der Rekonstitution variieren in der Zugabe der Eisenionen entweder als  $\text{FeSO}_4$  oder  $\text{FeCl}_3$ , und in der Salzkonzentration der Pufferbedingungen, welche entweder durch Dialyse oder Verdünnen eingestellt werden (Jacobson et al., 1992), (Cheng et al., 1994), (Coghlan & Vickery, 1991), (Suhara et al., 1973), (Hong & Rabinowitz, 1967). Die Rekonstitution des Eisen-Schwefel-Clusters war im Falle des *Anabaena* Ferredoxins und des humanen Ferredoxins mit Trispuffer ohne NaCl oder KCl erfolgreich. Über einen Vergleich der Absorptionsspektren und der CD-Spektren von den rekombinant dargestellten Ferredoxinen mit denen der Wildtyp-Ferredoxine wurde festgestellt, dass die Geometrie der Eisen-Schwefel-Cluster und die Faltung der rekombinanten Proteine identisch mit denen der jeweiligen Wildtypferredoxine ist.

Das Rekonstitutionsverfahren unter reduzierenden und denaturierenden Bedingungen durch Zugabe von Eisen- und Sulfidionen stellt somit ein allgemeingültiges Protokoll für den Clustereinbau in Apoferreredoxine dar. Dabei liegen Eisen-Schwefel-Cluster verschiedener Zusammensetzung in Lösung in einem dynamischen Gleichgewicht vor ( $2\text{Fe-2S} \rightleftharpoons 4\text{Fe-4S} \rightleftharpoons 3\text{Fe-4S}$  etc.) (Beinert et al., 1997). Der Eisen-Schwefel-Komplex bewirkt die Faltung des Proteins, aber die Polypeptidkette legt die Zusammensetzung des Eisen-Schwefel-Clusters fest (Pagani et al., 1986). Das scheint auch „*in-vivo*“ der Fall zu sein. Das Ferredoxin aus *Thermotoga maritima*, welches einen 4Fe-4S enthält, kann als Holoprotein in *E. coli* exprimiert werden, obwohl *E. coli* selbst nur ein 2Fe-2S Ferredoxin produziert (Darimont & Sterner, 1994).

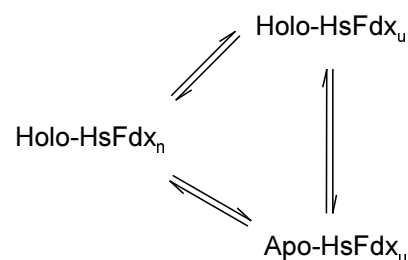
Die für mesophile Apoferreredoxine entwickelte Rekonstitution des Eisen-Schwefel-Clusters wurde durchgehend in Niedrigsalzlösung ohne NaCl oder KCl durchgeführt. Die Apoproteine besitzen keine native Faltung, erst der Clustereinbau bewirkt die Ausbildung der nativen dreidimensionalen Struktur.

Auch HsFdx besitzt nur in der Holoform die native Sekundär- und Tertiärstruktur, die Faltung des halophilen Proteins hängt unmittelbar mit dem Einbau des 2Fe-2S-Clusters zusammen. Die Darstellung des ungefalteten Apoproteins aus nativem HsFdx durch TCA Zugabe und die anschließende Rekonstitution des Eisen-Schwefel-Clusters unter Hochsalzbedingungen führte ebenfalls wieder zu einem Protein, dessen Absorptionsmaxima sich nicht von denen des Eduktes unterscheiden. Die Rekonstitution des Eisen-Schwefel-Clusters bewirkt also die Ausbildung der korrekten nativen Faltung. Allerdings wurde festgestellt, dass in Niedrigsalz eine Verschiebung der Absorptionsmaxima von 420 nm und 467 nm des Holo-Fdx zu 417 nm und 460 nm kommt. Die Änderung des Absorptionsspektrum läßt sich durch eine Änderung der lokalen Geometrie des Eisen-Schwefel-Clusters unter Niedrigsalzbedingungen erklären, was schon von Sonawat *et al.* beobachtet wurde (Bandyopadhyay et al., 2000). Die folgenden möglichen Konformationsänderungen sollen anhand eines 3-Zustandsmodell diskutiert werden.

Die eine Möglichkeit besteht darin, dass der Zerfall des nativen Holo-HsFdx (Holo-HsFdx<sub>n</sub>) zum nicht gefalteten Apo-HsFdx (Apo-HsFdx<sub>u</sub>) über das Holo-HsFdx ohne reguläre Sekundärstruktur stattfindet (Holo-HsFdx<sub>u</sub>).



Zum anderen könnte es sich bei den beiden ungefalteten Formen um zwei alternative Konformationen handeln, die unter denaturierenden Bedingungen eingenommen werden können.



Da Fdxana als Apoprotein exprimiert wurde, mußte eine Rekonstitution durchgeführt werden. Der Einbau des Eisen-Schwefel-Clusters war möglich, allerdings entsprachen die Absorptionsmaxima des Fdxana im sichtbaren Bereich mit 417 nm und 455 nm nicht den für Pflanzentypferredoxine charakteristischen Werten von 420 nm und 467 nm. (Bonomi & Kurtz, 1982). Diese Tatsache deutet darauf hin, dass es sich um ein teilweise denaturiertes Pflanzentypferredoxin handelt. Diese Vermutung konnte anhand von CD-Spektren belegt werden.

Die Deletion der Extra-Domäne des HsFdx bringt somit eine stärkere Störung der Sekundärstruktur des Ferredoxins mit sich als erwartet und macht eine für Pflanzentypferredoxine typische Faltung des Fdxana unmöglich.

Für die Rekonstitutionsreaktion wurde beobachtet, dass der Einbau des Eisen-Schwefel-Clusters bei der Mutante Fdxana unter Hochsalzbedingungen im Vergleich zur seiner Rekonstitution unter Niedrigsalzbedingungen nur zu 20% stattfand. Die Deletion der aciden Extra-Domäne bewirkt somit den Verlust der typisch halophilen Eigenschaft des HsFdx, den Eisen-Schwefel-Cluster nur unter Hochsalzbedingungen einzubauen. Die Rekonstitution des Fdxana hingegen findet unter den für mesophile Pflanzentypferredoxinen charakteristischen Bedingungen statt.

#### **4.5.2 UV-VIS spektroskopische Untersuchungen zur Stabilität und Faltung von Fdxana im Vergleich zu Pflanzentypferredoxinen und HsFdx**

Die Einwirkung von Harnstoff und alkalischen Lösungen auf die Struktur des Spinatferredoxins wurde in Abhängigkeit von der Salzkonzentration untersucht (Hasumi et al., 1985; Hasumi & Ohmori, 1989). Dabei wurde festgestellt, dass bis zu einer Konzentration von 1 M NaCl eine Stabilisierung des Pflanzentypferredoxins erreicht wird. Eine durch 4 M Harnstoff hervorgerufene Strukturänderung des Spinatferredoxins in Niedrigsalzlösung, welche anhand der Änderung der Banden im CD-Spektrum und der Verschiebung der Absorptionsmaxima im sichtbaren Bereich identifiziert wurde, konnte durch Zugabe von 1 M NaCl rückgängig gemacht werden kann (Hasumi & Ohmori, 1989), (Petering & Palmer, 1970), (Bonomi & Kurtz, 1982). Durch Zugabe von insgesamt 8 M Harnstoff wurde der Eisen-Schwefel-Cluster irreversibel zerstört. Daher wurde angenommen, dass für das 2Fe-2S Spinatferredoxin ein Intermediat mit nur noch teilweise erhaltener Sekundärstruktur existiert. Erst nach Verlust des Eisen-Schwefel-Clusters wird die vollständig denaturierte Form erreicht.

Dieselbe Verschiebung der Absorptionsmaxima des Spinatferredoxins im sichtbaren Bereich von 420 nm und 467 nm zu niedrigeren Wellenlänge von 417 nm und 450 nm, die bei steigenden Harnstoffkonzentrationen zu sehen war, trat in stärker alkalischen Lösungen bei einer Erhöhung des pH Wertes von 7.3 auf 10.6 auf (Petering & Palmer, 1970). Die Zugabe von 1 M NaCl machte die Strukturänderungen des Spinatferredoxins unter diesen Bedingungen ebenfalls wieder rückgängig. Außerdem wurde die Behauptung aufgestellt, dass



sich ein geringer Strukturunterschied dieses Pflanzentypferredoxins unter Hoch- und Niedrigsalzbedingungen an den leicht zu niedrigeren Wellenlängen verschobenen Absorptionsmaxima erkennen läßt.

Für HsFdx konnte in Gegenwart von 4.3 M NaCl auch durch Zugabe von 8 M Harnstoff keine Änderung der Absorptionsmaxima erreicht werden. Somit ist HsFdx unter Hochsalzbedingungen deutlich stabiler als Spinatferredoxin unter Niedrigsalzbedingungen. Für Fdxana wurde gezeigt, dass die Mutante nicht durch Zugabe von 1 M NaCl stabilisiert oder in die native Form gebracht werden konnte.

Die Deletion der aciden Extra-Domäne bewirkt also zum einen, dass das rekombinante Protein ausschließlich in dem mesophilen Organismus *E. coli* exprimiert wird. Zum anderen ist der Einbau des Eisen-Schwefel-Clusters bei Fdxana unter Niedrigsalzbedingungen möglich. Ob die Konformation der Extra-Domäne des HsFdx seiner Faltung unter Niedrigsalzbedingungen entgegenwirkt, oder ob die korrekte Faltung der Extra-Domäne unter Hochsalzbedingungen Voraussetzung für die Rekonstitution ist, kann nicht geklärt werden.

HsFdx wird ebenso wie Pflanzentypferredoxine durch höhere Salzkonzentrationen stabilisiert. Aber das HsFdx baut im Gegensatz zu den Pflanzentypferredoxinen und der Mutante Fdxana ohne die Extra-Domäne nicht unter Niedrigsalzbedingungen den Eisen-Schwefel-Cluster ein. Statt dessen findet die Rekonstitution und die Faltung des HsFdx nur unter Hochsalzbedingungen statt. Die Salzabhängigkeit des Clustereinbaus und damit die Faltung des HsFdx werden somit entscheidend von der Extra-Domäne beeinflusst. Die Insertion bewirkt das für halophile Ferredoxine typische Verhalten in Abhängigkeit von der Salzkonzentration.

## 5 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Funktion der aus 30 Aminosäuren bestehenden Insertion in halophilen Ferredoxinen am Beispiel des HsFdx untersucht. Dabei wurde der Einfluß dieser aciden Extra-Domäne auf den halophilen Charakter des Proteins studiert.

Bei HsFdx handelt es sich um eine lösliches Protein aus dem halophilen Organismus *H. salinarum*, dessen Stabilität mit steigender Salzkonzentration deutlich zunimmt. Dies konnte mit Hilfe temperaturabhängiger UV-VIS-Messungen und anhand von CD- und DSC-Messungen eindeutig belegt werden.

Da es sich bei der Halophilie um eine Eigenschaft handelt, die auf der Wechselwirkungen eines Proteins mit Solvensmolekülen und gelösten Substanzen beruht, wurde die Struktur des HsFdx in Lösung analysiert. Die „*ab initio*“ Strukturberechnung erfolgte über die Analyse der NMR-Spektren vom  $^{15}\text{N}$  und  $^{15}\text{N}$ - $^{13}\text{C}$ -markierten HsFdx in 450 mM NaCl, 50 mM Natriumphosphatpuffer bei pH 6.5. Es wurden zwei Ansätze gerechnet: die Strukturenschar mit dem PDB Datenbankeintrag 1EOZ enthält Distanzbeschränkungen aus der Kristallstruktur des HmFdx für die Aminosäuren in der Nähe des paramagnetischen Eisen-Schwefel-Clusters, welche in NMR-spektroskopischen Messungen nicht zugänglich waren. Die Strukturenschar mit dem PDB Datenbankeintrag 1E10 wurde ausschließlich anhand der NMR-Daten berechnet. Beide Strukturmodelle weisen die gleichen Sekundärstrukturelemente und Tertiärstruktur auf. Der *rmsd* Wert von 0.9 Å des  $\text{C}_\alpha$ -Rückgrates von 1E10 im Vergleich zu 0.8 Å für 1EOZ zeigt, dass eine gute Strukturberechnung ohne die Hinzunahme von Distanzbeschränkungen aus bekannten Kristallstrukturen für HsFdx möglich ist. Das halophile Ferredoxin zeichnet sich durch ein viersträngiges  $\beta$ -Faltblatt aus, welches von einer Helix flankiert wird. Zwischen Strang  $\beta_1$  und  $\beta_2$  befindet sich die halophile Extra-Domäne, welche aus den Helices  $\alpha_1$  und  $\alpha_2$  aufgebaut ist.

Der Vergleich der Struktur des HsFdx in Lösung mit der Kristallstruktur des homologen Ferredoxins aus *H. marismortui* macht deutlich, dass die halophilen Proteine in Lösung und im Festkörper dieselben Sekundär- und Tertiärstrukturen besitzen. Die NMR-spektroskopisch bestimmten Flexibilitäten ergaben, dass es sich bei HsFdx um ein starres Molekül handelt. Die Beweglichkeit der Aminosäuren in der halophilen Extra-Domäne und aus anderen Bereichen des HsFdx ist vergleichbar. Über temperaturabhängige NMR-Messungen wurde

festgestellt, dass die Entfaltung des Proteins homogen verläuft und nicht durch die Denaturierung der aciden Extra-Domäne initiiert wird.

Wird das halophile Ferredoxin mit den Pflanzentypferredoxinen aus *Anabaena* und *E. arvense* verglichen, so läßt sich feststellen, dass sich in den mesophilen Ferredoxinen anstelle der sauren Helices  $\alpha'$  und  $\alpha''$  nur ein kurzer Loop befindet. Deshalb wurden zwei Mutanten (Fdxana und Fdxequi) des HsFdx dargestellt, in denen diese halophile Extra-Domäne deletiert ist. Dabei wurde festgestellt, dass der halophile Organismus *H. salinarum* bevorzugt HsFdx exprimiert, und dass sich Fdxana und Fdxequi in *E. coli* exprimieren lassen. Für Fdxana wurde eine chromatographische Aufreinigung entwickelt. Da die Mutante als Apoprotein exprimiert wurde, mußte außerdem ein Rekonstitutionsprotokoll erstellt werden.

Das Apo-HsFdx des Wildtyp-Ferredoxins wurde durch Zugabe von Trichloressigsäure erhalten. Der Eisen-Schwefel-Cluster konnte in Gegenwart von  $\text{Fe}^{2+}$  und  $\text{S}^{2-}$  unter Hochsalzbedingungen (4.3 M NaCl) wiederhergestellt werden. Bei geringer NaCl-Konzentration fand der Clustereinbau nur partiell oder gar nicht statt.

Die Rekonstitution des Fdxana im Cytosol war im Gegensatz zum HsFdx unter Niedrigsalzbedingungen deutlich effektiver als in 1 M NaCl. Allerdings wurde nur das Holo-Fdxana ohne korrekte Sekundärstruktur erhalten. Eine Stabilisierung der Mutante durch Zugabe von NaCl war nicht möglich.

Die oben beschriebenen Effekte führen zu dem Schluß, dass die Extra-Domäne die halophilen Eigenschaften des HsFdx durch ihren Einfluß auf die Rekonstitution und die Faltung des Proteins bewirkt. Im Genom des *H. salinarum* wurden etwa 100 weitere Proteine gefunden, die eine Insertion von 30, vorwiegend sauren Aminosäuren im Vergleich zu ihren mesophilen Analoga besitzen. Die Ausbildung einer stark negativ geladenen Extra-Domäne könnte damit neben der Anhäufung saurer Reste auf der gesamten Oberfläche von halophilen Proteinen einen zweiten Mechanismus der halophilen Adaptation darstellen, der eine rasche Anpassung von Proteinen an Hochsalzbedingungen ermöglicht.

## 6 Anhang

### 6.1 Abkürzungsverzeichnis

Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
bidest.	Bidestilliert
bp	Basenpaare
BPTI	Bovine Pancreatic Trypsin Inhibitor
BR	Bakteriorhodopsin
CD	Circular Dichroism
COSY	Correlation Spectroscopy
Cp	Wärmekapazität bei konstantem Druck
DNA	Desoxyribonukleinsäure
CSI	<i>Chemical Shift Index</i>
dNTP's	Mischung aus Desoxyribonukleosidtriphosphaten
DMSO	Dimethylsulfoxid
DSC	Differential Scanning Calorimetry
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Fdxana	Mutante des HsFdx mit dem Loop (9-15) aus <i>Anabaena</i> anstelle der Reste (7-36)
Fdxequi	Mutante des HsFdx mit dem Loop (8-12) aus <i>E. arvense</i> anstelle der Reste (7-36)
FPLC	Fast Pressure Liquid Chromatography
FNR	Ferredoxin-NADP <sup>+</sup> -Reduktase
GST	Glutathion S-Transferase
HAc	Essigsäure
HmFdx	Ferredoxin aus <i>Haloarcula marismortui</i>
HmMDH	Malatdehydrogenase aus <i>Haloarcula marismortui</i>

---

HsFdx	Ferredoxin aus <i>Halobacterium salinarum</i>
HSQC	Heteronukleare Einkanzenkohärenz
HvFdx	Ferredoxin aus <i>Haloferax volcanii</i>
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
kDa	Kilodalton
kb	Kilobasen
Kan	Kanamycin
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
MW	Molekulargewicht
MCS	multiple cloning site
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
NOESY	Nuclear Overhauser and Exchange Spectroscopy
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
rmsd	route mean square deviation
PMSF	Phenylmethylen-sulfonylfluorid
rpm	rotations per minute
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
T	Temperatur
TB	Terrific Broth
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TOCSY	Total Correlation Spectroscopy
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	<i>unit</i> als Einheit einer Enzymaktivität
üN	über Nacht
UV	Ultraviolett
Wt	Wildtyp

## 6.2 Abkürzungen der Aminosäuren/ Einbuchstabencode

A	Ala	Alanin
C	Cys	Cystein
D	Asp	Aspartat
E	Glu	Glutamat
F	Phe	Phenylalanin
G	Gly	Glycin
H	His	Histidin
I	Ile	Isoleucin
K	Lys	Lysin
L	Leu	Leucin
M	Met	Methionin
N	Asn	Asparagin
P	Pro	Prolin
Q	Gln	Glutamin
R	Arg	Arginin
S	Ser	Serin
T	Thr	Threonin
V	Val	Valin
W	Trp	Tryptophan
Y	Tyr	Tyrosin

## 6.3 Tabellarische Übersicht: HsFdx und Fdxana im Vergleich

### 6.3.1 Rekonstitution von HsFdx und Fdxana

c(NaCl)	0 mM	150 mM	430 mM	2 M
HsFdx ( $A_{420\text{ nm}/280\text{ nm}}$ )	0.0	0.0	0.2	0.33
Fdxana ( $A_{420\text{ nm}}$ ) <sup>1</sup>	100%	-	-	25%

<sup>1</sup> Die Messung fand im cytosolischen Extrakt statt, deshalb war eine Absolutbestimmung wie bei HsFdx nicht möglich. Die Absorption von Fdxana bei 420 nm nach der Rekonstitution in 0 mM NaCl wurde als Referenzwert (100%) festgelegt.

### 6.3.2 Löslichkeit und Stabilität von HsFdx und Fdxana

Protein	Löslich bis % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Änderung der Stabilität mit steigender NaCl-Konzentration
HsFdx	70%	nimmt stark zu [ $T_m(150\text{ mM NaCl}) = 49\text{ °C}$ , $T_m(4.3\text{ M NaCl}) = 85\text{ °C}$ ]
Fdxana	30%	Nimmt ab [Absorption im sichtbaren Bereich nach zwei Tagen bei 4 °C: $A_{417\text{ nm}}(150\text{ mM NaCl}) = 85\%$ , $A_{417\text{ nm}}(1\text{ M NaCl}) = 65\%$ ]

## 7 Literatur

- Agar, J. N., Krebs, C., Frazzon, J., Huynh, B. H., Dean, D. R. J. & Johnson, M. K. (2000). IscU as a Scaffold for Iron-Sulfur Cluster Biosynthesis: Sequential Assembly of [2Fe-2S] and [4Fe-4S] -Clusters in IscU. *Biochemistry* **39**, 7856-7862.
- Aliverti, A., Livraghi, A., Piubelli, L. & Zanetti, G. (1997). On the role of the acidic cluster Glu92-94 of spinach ferredoxin I. *Biochem. Biophys. Acta* **1342**, 45-50.
- Bandyopadhyay, A. K., Krishnamoorthy, G. & Sonawat, H. M. (2000). Structural stabilization of [2Fe-2S] Ferredoxin from *Halobacterium salinarum*. *Biochemistry*, PAGE EST:8.7.
- Bandyopadhyay, A. K. & Sonawat, H. M. (2000). Salt dependent stability and unfolding of [Fe<sub>2</sub>-S<sub>2</sub>] Ferredoxin of *Halobacterium salinarum*: Spectroscopic investigations. *Biophys. J.* **79**, 501-510.
- Baumann, B., Sticht, H., Schärpf, M., Sutter, M., Haehnel, W. & Rösch, P. (1996). Structure of *Synechococcus elongatus* [Fe<sub>2</sub>S<sub>2</sub>] Ferredoxin in Solution. *Biochemistry* **35**, 12831-12841.
- Beeser, S. A., Goldenberg, D. P. & Oas, T. G. (1997). Enhanced Protein Flexibility Caused by a Destabilizing Amino Acid Replacement in BPTI. *J. Mol. Biol.* **269**, 154-164.
- Beinert, H., Richard, H. H. & Münck, E. (1997). Iron-Sulfur Clusters: Nature's Modular, Multipurpose Structures. *Science* **277**, 653-659.
- Berg, J. M. & Holm, R. H. (1982). *Iron-Sulfur Proteins*. Wiley-Interscience, New York edit, Spiro, T. G.
- Bernhardt, R., Muller, A., Uhlmann, H., Grinberg, A., Muller, J. J. & Heinemann, U. (1998). Structure of adrenodoxin and function in steroid hydroxylation. *Endocr. Res.* **24**, 531-539.
- Blake, P. R., Park, J.-B., Zhou, Z. H., Hare, D. R., Adams, M. W. W. & Summers, M. F. (1992). Solution-state structure by NMR of zinc-substituted rubredoxin from the marine hyperthermophilic archaeobacterium *Pyrococcus furiosus*. *Protein Sci.* **1**, 1508-1521.



- Blecher, O., Gloldman, S. & Mevarech, M. (1993). High expression in *Escherichia coli* of the gene coding for dihydrofolate reductase of the extremely halophilic archaeobacterium *Haloferax volcanii*. *Eur. J. Biochem.* **216**, 199-203.
- Böhme, H. & Schrautemeier, B. (1987). Comparative characterization from heterocysts and vegetative cells of *Anabaena variabilis*. *Biochem. Biophys. Acta* **891**, 1-7.
- Bonete, M. J., Pire, C., Llorca, F. I. & Camacho, M. L. (1996). Glucose dehydrogenase from the halophilic Archaeon *Haloferax mediterranei*: enzyme purification, characterisation and N-terminal sequence. *FEBS Letters* **383**(3), 227-9.
- Bonnete, F., Ebel, C. & Zaccai, G. (1993). Biophysical study of halophilic malate dehydrogenase in solution: revised subunit structure and solvent interactions of native and recombinant enzyme. *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* **89**, 2659-2666.
- Bonnete, F., Madern, D. & Zaccai, G. (1994). Stability against denaturation mechanisms in halophilic malate dehydrogenase "adapt" to solvent conditions. *J. Mol. Biol.* **244**(4), 436-47.
- Bonomi, F. & Kurtz, D. M. J. (1982). Kinetics and Equilibria of Active Site Core Extrusion from Spinach Ferredoxin in Aqueous N, N-Dimethylformamide/Triton X-100 Solutions. *Biochemistry* **21**, 6838-6843.
- Brerenton, P. S., Megan, J. M., Tregloan, P. A. & Wedd, A. G. (1999). Investigation of the role of surface residues in the ferredoxin from *Clostridium pasteurianum*. *Biochem. Biophys. Acta* **1429**, 307-316.
- Britton, K. L., Stillman, T. J., Yip, K. S., Forterre, P., Engel, P. C. & Rice, D. W. (1998). Insights into the molecular basis of salt tolerance from the study of glutamate dehydrogenase from *Halobacterium salinarum*. *J. Biol. Chem.* **273**(15), 9023-30.
- Cendrin, F., Jouve, H. M., Gaillard, J., Thibault, P. & Zaccai, G. (1994). Purification and properties of a halophilic catalase-peroxidase from *Haloarcula marismortui*. *Biochem. Biophys. Acta* **1209**, 1-9.

Charlesbois, R. L., Schalkowyk, L. L., Hofman, J. D. & Doolittle, W. F. (1991). Detailed physical map and set of overlapping clones covering the genome of the archaebacterium *Haloferax volcanii* DS2. *J. Mol. Biol.* **222**, 509-524.

Cheng, H., Westler, W. M., Xia, B., Oh, B.-H. & Markley, J. L. (1995). Protein Expression, Selective Isotopic Labeling, and Analysis of Hyperfine-Shifted NMR Signals of *Anabaena* 7120 Vegetative [2Fe-2S] Ferredoxin. *Arch. Biochem. Biophys.* **316**, 619-634.

Cheng, H., Xia, B., Reed, G. H. & Markley, J. L. (1994). Optical, EPR, and <sup>1</sup>H NMR Spectroscopy of Serine-Ligated [2Fe-2S] Ferredoxins produced by Site-Directed Mutagenesis of Cysteine Residues in Recombinant *Anabaena* 7120 Vegetative Ferredoxin. *Biochemistry* **33**, 3155-3165.

Christian, J. H. B. & Waltho, J. A. (1962). Solute concentrations within cells of halophilic and non-halophilic bacteria. *Biochem. Biophys. Acta* **65**, 506-508.

Coghlan, V. & Vickery, L. E. (1991). Site-specific Mutations in Human Ferredoxin That Affect Binding to Ferredoxin Reductase and Cytochrome P450<sub>sec</sub>\*. *J. Biol. Chem.* **266**, 18606-18612.

Connaris, H., Chaudhuri, J. B., Danson, M. J. & Hough, D. W. (1999). Expression, Reactivation, and Purification of Enzymes from *Haloferax volcanii* in *Escherichia coli*. *Biotech. Bioeng.* **64**, 38-45.

Darimont, B. & Sterner, R. (1994). Sequence, assembly and evolution of a primordial ferredoxin from *Thermotoga maritima*. *EMBO* **13**, 1772-1781.

Dym, O., Mevarech, M. & Sussmann, J. L. (1995). Structural features that stabilize halophilic malate dehydrogenase from an archaebacterium. *Science* **267**, 1344-1346.

Ebel, C., Altekari, W., Langowski, J., Urbanke, C., Forest, E. & Zaccai, G. (1995). Solution structure of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Haloarcula vallismortis*. *Biophys. Chem.* **54**, 219-227.

- Ebel, C., Faou, P., Kernel, B. & Zaccai, G. (1999a). Relative role of anions and cations in the stabilization of halophilic malate dehydrogenase. *Biochemistry* **38**(28), 9039-47.
- Ebel, C., Faou, P. & Zaccai, G. (1999b). Protein-solvent and weak protein-protein interactions in halophilic malate dehydrogenase. *J. Crystal Growth* **196**, 395-402.
- Ebel, C., Guinet, F., Langowski, J., Urbanke, C., Gagnon, J. & Zaccai, G. (1992). Solution studies of elongation factor Tu from the extreme halophile *Halobacterium marismortui*. *J. Mol. Biol.* **223**(1), 361-71.
- Eisenberg, H. (1995). Life in unusual environments: progress in understanding the structure and function of enzymes from extreme halophilic bacteria. *Arch. Biochem. Biophys.* **318**(1), 1-5.
- Eisenberg, H., Mevarech, M. & Zaccai, G. (1992). Biochemical, structural, and molecular genetic aspects of halophilism. *Adv. Prot. Chem.* **43**, 1-62.
- Elcock, A. H. & McCammon, J. A. (1998). Electrostatic contributions to the stability of halophilic proteins. *J. Mol. Biol.* **280**(4), 731-48.
- Farrow, N. A., Ouwen, Z., Forman-Kay, J. & Kay, L. E. (1997). Characterization of the Backbone Dynamics of Folded and Denatured States of an SH3 Domain. *Biochemistry* **36**, 2390-2402.
- Ferrer, J., Cremades, R., Pire, C. & Bonete, M. J. (1998). Fluorescence and quenching comparative studies of halophilic and bovine glutamate dehydrogenase. *J. Photochem. Photobiol. B* **47**, 148-154.
- Frolow, F., Harel, M. & Sussman, J. L. (1996). Insights into protein adaptation to a saturated salt environment from the crystal structure of a halophilic 2Fe-2S ferredoxin. *Nature Struct. Biol.* **3**, 452.
- Frydman, J., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. & Hartl, F. U. (1999). Co-translational domain folding as the structural basis for the rapid de novo folding of firefly luciferase. *Nature Struct. Biol.* **6**, 697-705.

Frydman, J. & Hartl, F. U. (1996). Principles of Chaperone-Assisted Protein Folding: Differences Between in Vitro and in Vivo Mechanisms. *Science* **272**, 1497-1502.

Ginzburg, M., Sachs, L. & Ginzburg, B. Z. (1970). Ion Metabolism in a Halobacterium. *J. Gen. Phys.* **55**, 187-206.

Goldenberg, D. P., Kim, K.-S., Fuchs, J., Woodward, C. & Wlodawer, A. (1991). Crystal structure of a Y35G mutant of bovine pancreatic trypsin inhibitor. *J. Mol. Biol.* **220**, 757-770.

Goodfellow, B. J. & Macedo, A. L. (1999). NMR Studies of Iron-Sulfur Proteins. *Ann. R. NMR S.* **37**, 119-177.

Guillouard, I., Lagoutte, B., Moal, G. & Bottin, H. (2000). Importance of the Region Including Aspartates 57 and 60 of Ferredoxin on the Electron Transfer Complex with Photosystem I in the Cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **271**, 647-653.

Haar, F. v. d. (1976). Purification of proteins by fractional interfacial salting out on unsubstituted agarose. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **70**, 1009-1013.

Hase, T., Wada, H. & Matsubura, H. (1977a). Horsetail (*Equisetum arvense*) Ferredoxins I and II. *J. Biochem.* **82**, 277-286.

Hase, T., Wakabayashi, S., Matsubura, H., Kerscher, L., Oesterhelt, D., Rao, K. K. & Hall, D. O. (1977b). *Halobacterium halobium* ferredoxin: A homologous protein to chloroplast-type ferredoxins. *FEBS Letters* **77**, 308-310.

Hasumi, H., Nagata, E. & Nakamura, S. (1985). Spectrophotometric Studies on Alkaline Isomerization of Spinach Ferredoxin. *J. Biochem.* **98**, 981-990.

Hasumi, H. & Ohmori, D. (1989). Studies on the molecular structure of spinach ferredoxin. II. Effects of urea and sodium chloride. *Biochem. Biophys. Acta* **998**, 173-180.

Hong, J.-S. & Rabinowitz, J. C. (1967). Preparation and Properties of Clostridial Apoferreredoxins. *Biochem. Biophys. Acta* **29**, 246-252.

- Hurley, J. K., Schmeits, J. L., Genzor, C., Gomez-Moreno, C. & Tollin, G. (1996). Charge Reversal Mutants in a Conserved Acidic Patch in *Anabaena* Ferredoxin Can Attenuate or Enhance Electron Transfer to Ferredoxin:NADP<sup>+</sup> Reductase by Altering Protein/Protein Orientation within the Intermediate Complex. *Arch. Biochem. Biophys.* **333**, 243-250.
- Hurley, J. K., Weber-Main, A. M., Stankovich, M. T., Thoden, J. B., Vanhooke, J. L., Holden, H. M., Chae, Y. K., Xia, B., Cheng, H., Markley, J. L., Martinez-Julvez, M., Gomez-Moreno, C., Schmeits, J. L. & Tollin, G. (1997). Structure-Function Relationship in *Anabaena* Ferredoxin: Correlations between X-ray Crystal Structures, Reduction Potentials, and Rate Constants of Electron Transfer to Ferredoxin: NADP<sup>+</sup> Reductase for Site-Specific Ferredoxin Mutants. *Biochemistry* **36**, 11100-11117.
- Ikemizu, S., Bando, M., Morimoto, Y., Tsukihara, T. & Fukuyama, K. (1994). Structure of [2Fe-2S] Ferredoxin-I from *Equisetum arvense* at 1.8 Angstrom Resolution. *Acta Crystallogr. D* **50**, 167.
- Jacobson, B. L., Chae, Y. K., Böhme, H., Markley, J. L. & Holden, H. M. (1992). Crystallization and Preliminary Analysis of Oxidized, Recombinant, Heterocyst [2Fe-2S] Ferredoxin from *Anabaena* 7120. *Arch. Biochem. Biophys.* **294**, 279-281.
- Jaenicke, R. (1991). Protein stability and molecular adaptation to extreme conditions. *Eur. J. Biochem.* **202**(3), 715-28.
- Jaenicke, R. & Böhm, G. (1998). The stability of proteins in extreme environments. *Curr. Opin. Struc. Biol.* **8**, 738-748.
- Jolley, K. A., Russell, R. J., Hough, D. W. & Danson, M. J. (1997). Site-directed mutagenesis and halophilicity of dihydrolipoamide dehydrogenase from the halophilic archaeon, *Haloferax volcanii*. *Eur. J. Biochem.* **248**(2), 362-8.
- Kay, L. E., Torchia, D. A. & Bax, A. (1989). Backbone Dynamics of Proteins as studied by <sup>15</sup>N Inverse Detected Heteronuclear NMR Spectroscopy: Application to Staphylococcal Nuclease. *Biochemistry* **28**, 8972-8979.

Kazanis, S. & Pochapsky, T. C. (1997). Structural features of the metal binding site and dynamics of gallium putidaredoxin, a diamagnetic derivative of a Cys<sub>4</sub>Fe<sub>2</sub>S<sub>2</sub> ferredoxin. *J. Biomol. NMR* **9**, 337-346.

Kerscher, L. (1976). Isolierung und Charakterisierung eines Ferredoxins vom Pflanzentyp aus Halobakterien. Diplomarbeit, Julius-Maximilians-Universität Würzburg.

Kerscher, L., Nowitzki, S. & Oesterhelt, D. (1982). Thermoacidophilic Archaeobacteria Contain Bacterial-Type Ferredoxins Acting as Electron Acceptors of 2-Oxoacid:Ferredoxin Oxidoreductases. *Eur. J. Biochem.* **128**, 223-230.

Kerscher, L. & Oesterhelt, D. (1981). The catalytic mechanism of 2-oxoacid:ferredoxin oxidoreductases from *Halobacterium halobium*. *Eur. J. Biochem.* **116**, 595-600.

Kerscher, L., Oesterhelt, D., Cammack, R. & Hall, D. O. (1976). A new plant-type ferredoxin from halobacteria. *Eur. J. Biochem.* **71**, 101-107.

Krishnan, G. & Altekari, W. (1993). Halophilic class I aldolase and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: some salt-dependent structural features. *Biochemistry* **32**(3), 791-8.

Kümmerle, R., Kyritsis, P., Gaillard, J. & Moulis, J.-M. (2000). Electron transfer properties of iron-sulfur proteins. *J. Inorg. Chem.* **79**, 83-91.

Kuntz, I. D. (1971). Hydration of Macromolecules. Hydration of Polypeptides. *J. Am. Chem. Soc.*, 514-518.

Larsen, H. (1967). Biochemical Aspects of Extreme Halophilism. *Microbial Physiology* **1**, 97-133.

Leicht, W., Werber, M. M. & Eisenberg, H. (1978). Purification and Characterization of glutamate dehydrogenase from *Halobacterium* of the Dead Sea. *Biochemistry* **17**, 4004-4010.

Lelong, C., Sétif, P., Hervé, B., André, F. & Neumann, J.-M. (1995). <sup>1</sup>H and <sup>15</sup>N NMR Assignment, Secondary Structure and Tertiary Fold of [2Fe-2S] Ferredoxin from *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Biochemistry* **34**, 14462-14473.

- Lelong, C., Setif, P., Lagoutte, B. & Bottin, H. (1994). Identification of amino acids involved in the functional interaction between photosystem I and ferredoxin from *Synechocystis* sp. PCC 6803 by chemical cross-linking. *J. Biol. Chem.* **269**, 10034-10039.
- Levinthal, C. (1969). *Mossbauer Spectroscopy in Biological Systems*, Allerton House, Monicello, Illinois.
- Lottspeich, F. & Zorbas, H. (1998). *Bioanalytik*, Spektrum Verlag.
- Madan, A. & Sonawat, H. M. (1996). Glucose dehydrogenase from *Halobacterium salinarum*: purification and salt dependent stability. *Physiol. Chem. Phys. Med. NMR* **28**, 15-28.
- Madern, D., Ebel, C. & Zaccai, G. (2000). Halophilic adaptation of enzymes. *Extremophiles* **4**(2), 91-8.
- Madern, D., Pfister, C. & Zaccai, G. (1995). Mutation at a single acidic amino acid enhances the halophilic behaviour of malate dehydrogenase from *Haloarcula marismortui* in physiological salts. *Eur. J. Biochem.* **230**(3), 1088-95.
- Madern, D. & Zaccai, G. (1997). Stabilisation of halophilic malate dehydrogenase from *Haloarcula marismortui* by divalent cations - effects of temperature, water isotope, cofactor and pH. *Eur. J. Biochem.* **249**(2), 607-11.
- Madigan, M. T. & Marrs, B. L. (1997). Extremophiles. *Scientific American*, 66-71.
- Madigan, M. T. & Oren, A. (1999). Thermophilic and halophilic extremophiles. *Curr. Opin. Microbiol.* **2**(3), 265-9.
- Malkin, R. & Rabinowitz, J. C. (1966). The reconstitution of clostridial ferredoxin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **23**, 822-827.
- Marg, B., Schweimer, K., Sticht, H., Rösch, P. & Oesterhelt, D. (2001). Structural Analysis of Halophilic Proteins: *Halobacterium salinarum* Ferredoxin as a Model System. *Biophys. J.* **80**, 2540.

Matsuo, T., Ikeda, A., Seki, H., Ichimata, T., Sugimori, D. & Nakamura, S. (2001). Cloning and Expression of the ferredoxin gene from extremely halophilic archeon *Haloarcula japonica* strain TR-1. *BioMetals* **14**, 135-142.

Mengele, R. & Sumper, M. (1992). Drastic differences in glycosylation of related S-layer glykoproteins from moderate and extreme halophiles. *J. Biol. Chem.* **267**, 8182-8185.

Mevarech, M., Frolow, F. & Gloss, L. M. (2000). Halophilic enzymes: proteins with a grain of salt. *Biophys. Chem.* **86**, 155-164.

Mevarech, M. & Werczberger, R. (1985). Genetic Transfer in *Halobacterium volcanii*. *J. Bacteriol.* **162**, 162-163.

Mo, H., Pochapsky, S. S. & Pochapsky, T. C. (1999). A Model for the Solution Structure of Oxidized Terpredoxin, a Fe<sub>2</sub>S<sub>2</sub> Ferredoxin from Pseudomonas. *Biochemistry* **38**, 5666-5675.

Mullakhanbhai, M. F. & Larsen, H. (1975). *Halobacterium volcanii* spec. nov., a novel dead sea halobacterium with a moderate salt requirement. *Arch. Microbiol.* **104**, 207-214.

Nakamura, M., Saeki, K. & Takahashi, Y. (1999). Hyperproduction of Recombinant Ferredoxins in *Escherichia coli* by Coexpression of the ORF1-ORF2-iscS-iscU-iscA-hscB-hscA-fdx-ORF3 Gene Cluster. *J. Biochem.* **126**, 10-18.

Netzer, W. J. & Hartl, F. U. (1998). Protein folding in the cytosol: chaperonin-dependent and -independent mechanisms. *Trends Biochem. Sci.* **23**, 68-73.

Ng, W. V., Kennedy, S. P., Mahairas, G. G., et al. & DasSarma, S. (2000). Genome sequence of *H. salinarum* species NRC-1. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **22**, 12176-12181.

Oesterhelt, D. (1995). *Isolation of Purple Membranes*. Archaea, a Laboratory Manual (DasSarma, S. & Fleischmann, E. M., Eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Oh, B.-H. & Markley, J. L. (1990). Multinuclear Magnetic Resonance Studies of the 2Fe-2S\* Ferredoxin from *Anabaena* Species Strain PCC 7120. 1. Sequence specific Hydrogen-1 Resonance Assignments and Secondary Structure in Solution of the Oxidized Form. *Biochemistry* **29**, 3993-4004.



- Olsen, G. J. (1994). Archaea, Archaea, everywhere. *Nature* **371**, 657-658.
- Pace, C. N. (1995). Evaluating Contribution of Hydrogen bonding and Hydrophobic Bonding to Protein Folding. *Methods Enzymol.* **259**, 538-554.
- Pagani, S., Vecchio, G., Iametti, S., Bianchi, R. & Bonomi, F. (1986). On the role of the 2Fe-2S cluster in the formation of the structure of spinach ferredoxin. *Biochem. Biophys. Acta* **870**, 538-544.
- Petering, D. H. & Palmer, G. (1970). Properties of Spinach Ferredoxin in Anaerobic Urea Solution: A Comparison with the Native Protein. *Arch. Biochem. Biophys.* **141**, 456-464.
- Pfeifer, F., Griffig, J. & Oesterhelt, D. (1993). The fdx gene encoding the [2Fe-2S] ferredoxin of *Halobacterium salinarum* (*H. halobium*). *Mol. Gen. Genet.* **239**, 66-71.
- Pieper, U., Kapadia, G., Mevarech, M. & Herzberg, O. (1998). Structural features of halophilicity derived from the crystal structure of dihydrofolate reductase from the Dead Sea halophilic archaeon, *Haloferax volcanii*. *Structure* **6**(1), 75-88.
- Pochapsky, T. C., Ye, Y. M., Ratnaswamy, G. & Lyons, T. A. (1994). An NMR-Derived Model for the Solution Structure of Oxidized Putidaredoxin, a 2-Fe, 2-S Ferredoxin from *Pseudomonas*. *Biochemistry* **33**, 6424-6432.
- Rao, J. K. & Argos, P. (1981). Structural stability of halophilic proteins. *Biochemistry* **20**(23), 6536-43.
- Remmele, R. L. J., Nightlinger, N. S., Srinivasan, S. & Gombotz, W. R. (1998). Interleukin-1 Receptor (IL-1R) Liquid Formulation Development Using Differential Scanning Calorimetry. *Pharmaceutical Research* **15**, 200-208.
- Richard, S. B., Madern, D., Garcin, E. & Zaccai, G. (2000). Halophilic adaptation: novel solvent protein interactions observed in the 2.9 and 2.6 Å resolution structures of the wild type and a mutant of malate dehydrogenase from *Haloarcula marismortui*. *Biochemistry* **39**(5), 992-1000.

Rothschild, J. L. & Mancinelli, R. L. (2001). Life in extreme environments. *Nature* **409**, 1092-1101.

Rypniewski, W. R., Breiter, D. R., Benning, M. M., Wesenberg, G., Oh, B.-H., Markley, J. L., Rayment, I. & Holden, H. M. (1991). Crystallization and structure determination to 2.5-Å resolution of the oxidized [2Fe-2S] ferredoxin isolated from *Anabaena* 7120. *Biochemistry* **30**, 4126.

Schmitt, C. (1997). Studien zur halobakteriellen Chemotaxis. Doktorarbeit, Max-Planck-Institut für Biochemie.

Schweimer, K., Marg, B.-L., Oesterhelt, D., Rösch, P. & Sticht, H. (2000). Sequence-specific  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$  resonance assignments and secondary structure of [2Fe-2S] ferredoxin from *Halobacterium salinarum*. *J. Biomol. NMR* **16**, 347-348.

Sticht, H. & Rösch, P. (1998). The structure of iron-sulfur proteins. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **70**(2), 95-136.

Suhara, K., Kanayama, K., Takemori, S. & Karagigi, M. (1973). Bovine adrenal steroid hydroxylase system III. Reconstitution of adrenal iron-sulfur protein. *Biochem. Biophys. Acta*, 307-321.

Swartz, P. D., Beck, B. W. & Ichiye, T. (1996). Structural Origins of Redox Potentials in Fe-S Proteins: Electrostatic Potentials of Crystal Structures. *Biophys. J.* **71**, 2958-2969.

Vo, E., Wang, H. C. & Germanas, J. P. (1997). Preparation and Characterization of [2Ga-2S] *Anabaena* 7120 Ferredoxin, the first Gallium-Sulfur Cluster-Containing Protein. *J. Am. Chem. Soc.* **119**, 1934-1940.

Wächtershäuser, G. (1992). Groundworks for an evolutionary biochemistry: the iron-sulfur world. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **58**, 85-201.

Werber, M. M. & Mevarech, M. (1978a). Induction of a Dissimilatory Reduction Pathway of Nitrate in *Halobacterium* of the Dead Sea. *Arch. Biochem. Biophys.* **186**, 60-65.

- Werber, M. M. & Mevarech, M. (1978b). Purification and characterization of a highly acidic 2Fe-Ferredoxin from Halobacterium of the Dead Sea. *Arch. Biochem. Biophys.* **187**, 447-456.
- Wheelis, M. L., Kandler, O. & Woese, C. R. (1992). On the nature of global classification. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 2930-2934.
- Wishart, D. S., Sykes, B. D. & Richards, F. M. (1992). The Chemical Shift Index: A Fast and Simple Method für the Assignment of Protein Secondary Structure through NMR Spectroscopy. *Biochemistry* **31**, 1647-1651.
- Woese, C. R., Kandler, O. & Wheelis, M. L. (1990). Towards a Natural System of Organisms: Proposal for the Domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 4576-4579.
- Xia, B., Cheng, H., Bandarian, V., Reed, G. H. & Markley, J. L. (1996). Human Ferredoxin: Overproduction in *Escherichia coli*, Reconstitution in Vitro, and Spectroscopic Studies of Iron-Sulfur Cluster Ligand Cysteine-to Serine Mutants. *Biochemistry* **35**, 9488-9495.
- Zaccai, G., Cendrin, F., Haik, Y., Borochoy, N. & Eisenberg, H. (1989). Stabilization of halophilic malate dehydrogenase. *J. Mol. Biol.* **208**(3), 491-500.
- Zheng, L., Cash, V. L., Flint, D. H. & Dean, D. R. (1998). Assembly of Iron-Sulfur Clusters. *J. Biol. Chem.* **273**, 13264-13272.
- Zusman, T., Rosenshine, I., Böhm, G., Jaenicke, R., Leskiw, B. & Mevarech, M. (1989). Dihydrofolate reductase of the extremely halophilic archaebacterium *Halobacterium volcanii*. The enzyme and its coding gene. *J. Biol. Chem.* **264**, 18878-18883.



## **Lebenslauf**

Name	Bianca-Lucia Marg
Geburtsdatum	26. Januar 1973
Geburtsort	Bielefeld

## **Schulbildung**

07/1979-06/1983	Klosterschule Bielefeld
07/1983-06/1992	Ratsgymnasium Bielefeld

## **Studium**

10/1992-06/1994	Grundstudium an der Universität Bielefeld
06/1994	Vordiplom
09/1994-06/1995	Praktikum an der Université de Versailles-St. Quentin-en-Yvelines in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. F. Sécheresse, Fachgebiet „Chimie des Solides Inorganiques“ gefördert durch den DAAD
07/1995-03/1998	Hauptstudium an der Universität Bielefeld
07/1997	Diplom-Prüfungen
07/1997-03/1998	Anfertigung der Diplomarbeit „Zeitaufgelöste Fluoreszenzspektroskopie zur Charakterisierung von DNA-Fragmenten unterschiedlicher Konformation“ unter der Betreuung von PD Dr. W. Eimer
04/1996-03/1998	Stipendiatin der Studienstiftung des Deutschen Volkes

## **Promotion**

Seit 07/1998	Anfertigung der Dissertation „Struktur und Halophilie eines archaealen Ferredoxins“ unter der Betreuung von Prof. Dr. D. Oesterhelt am Max-Planck Institut für Biochemie in Martinsried
07/1999-06/2001	Promotionsstipendium des Boehringer Ingelheim Fonds



## Danksagungen

An erster Stelle danke ich meinem Doktorvater Prof. Dr. D. Oesterheldt sehr herzlich für die freundliche Aufnahme in seiner Arbeitsgruppe. Er hat mich mit Motivation und Begeisterung unterstützt, und ich habe in dieser Zeit viel von ihm gelernt.

Meinen herzlichsten Dank ans Oe-Labor! Irene und Peter, die mir das Einleben im Labor leicht gemacht haben. Bettina, Brigitte und Susanne, die mir nicht nur in methodischen Fragen mit Rat und Tat zur Seite gestanden haben. Walter und Christian für die vielen interessanten Grundsatzdiskussionen. Walter ebenso wie Hüseyin für ihre Geduld bei der Beseitigung von Computerproblemen. Jörg und Frau Haack für die Hilfe bei organisatorischen Angelegenheiten und die zahlreichen (Über)lebenstipps. Jens und Andy wünsche ich weiterhin viel Erfolg.

Allen Mitgliedern des Arbeitskreises danke ich für die herzliche Atmosphäre, die Hilfsbereitschaft und das stetige Interesse.

Ebenso möchte ich mich für die exzellente technische Unterstützung bedanken: Karin Rodewald und Kiki Weyrauch für die DNA-Sequenzierung. Uta Schimanko für die Oligonukleotidsynthese. Walter Erhard für die Hilfe bei elektronischen und Johann Schiefele bei mechanischen Aufgaben. Elisabeth Weyher-Stingl danke ich vielmals für die freundliche Unterstützung bei der Aufnahme der CD- und DSC-Spektren.

Der Klettermannschaft Alex, Benjamin, Boris, Irene und Steffi danke ich für die entspannenden Stunden am Fels und in der Halle genauso wie für ihre Hilfe im Labor.

Der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. P. Rösch aus Bayreuth möchte ich ganz herzlich für die freundliche Aufnahme dort danken; vor allem PD Dr. Heinrich Sticht für seine sehr gute und engagierte Betreuung und Dr. Kristian Schweimer für die kompetente Arbeit im Rahmen unserer Kooperation.

Dem Boehringer Ingelheim Fonds danke ich zum einen für die finanzielle Unterstützung und zum anderen für die ebenso interessanten wie gelungenen Veranstaltungen.

Last but not least möchte ich meiner Familie danken: Meinem Opa Werner und Berenice, die sich immer für meine Fortschritte im Labor und im Leben interessiert und daran beteiligt haben.

Beatrice und Derk für ihre tatkräftige Unterstützung. Derk außerdem für sein Verständnis und den Rückhalt.

Meinen Eltern werde ich niemals genug danken können für ihr Vertrauen, ihre Zuneigung und die Tatsache, dass ich immer mit ihrer Hilfe rechnen kann.



